

Catalina Esther Avendaño Valenzuela

# Contribución al conocimiento de la criptosporidiosis en diferentes regiones de Colombia a partir de aislados procedentes de humanos y diversas especies animales

Departamento  
Patología Animal

Director/es  
SANCHEZ ACEDO, CARIDAD  
QUILEZ CINCA, JOAQUIN

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

# CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS EN DIFERNTES REGIONES DE COLOMBIA A PARTIR DE AISLADOS PROCEDENTES DE HUMANOS Y

Autor

Catalina Esther Avendaño Valenzuela

Director/es

SANCHEZ ACEDO, CARIDAD  
QUILEZ CINCA, JOAQUIN

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Patología Animal

2018





**CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA  
CRIPTOSPORIDIOSIS EN DIFERENTES REGIONES DE  
COLOMBIA A PARTIR DE AISLADOS PROCEDENTES  
DE HUMANOS Y DIVERSAS ESPECIES ANIMALES**

TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

- 2018 -





# CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS EN DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA A PARTIR DE AISLADOS PROCEDENTES DE HUMANOS Y DIVERSAS ESPECIES ANIMALES

## TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por Dña. **Catalina Esther Avendaño Valenzuela** para  
optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Trabajo realizado en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de  
Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

Dirigida por el Dr. **Joaquín Quílez Cinca** y la Dra. **Caridad Sánchez Acedo**

**Zaragoza, 2018**





Departamento de  
Patología Animal  
**Universidad Zaragoza**

D. **Joaquín Quílez Cinca**, Profesor Titular de Universidad del área de Sanidad Animal, y Dña. **Caridad Sánchez-Acedo**, Catedrática de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, ambos adscritos al Departamento de Patología Animal de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN:

Que la Tesis titulada *“Contribución al conocimiento de la criptosporidiosis en diferentes regiones de Colombia a partir de aislados procedentes de humanos y diversas especies animales”*, de la que es autora **Catalina Esther Avendaño Valenzuela**, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente en Zaragoza, a 15 de febrero de 2018.

Fdo: Joaquín Quílez Cinca

Fdo: Caridad Sánchez Acedo





## Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directores de Tesis, Joaquín Quílez Cinca y Caridad Sánchez Acedo por su constante apoyo y orientación. Joaquín, gracias por toda tu paciencia y todas las orientaciones dadas cuando nada nos salía. Cari, gracias por haber confiado en mí desde el principio.

A Ana y a Claudia, mil y mil gracias por toda la ayuda con las PCR que nos iban enloqueciendo un poco, sin su ayuda definitivamente no lo habría logrado. Gracias a Fernando, Agustín, Emilio, Luis, Teresa, nuevamente Joaquín, Claudia, Cari y Ana por acogerme y hacer mis estancias muy agradables.

A mi familia, mi hijo, mi madre y mis hermanos gracias porque cuando lo necesité cada uno me ayudó a su manera, pero especialmente gracias a mi hijo por su paciencia al esperar largos ratos a que terminara de leer o escribir para poder salir a divertimos.

A la gente de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, Manuel Elkin Patarroyo, Manuel Alfonso Patarroyo y Diana Díaz, por compartir conmigo su vasto conocimiento.

A Jairo Oviedo, Fanny Guzmán y Mark Jenkins por su contribución en el aparte para la búsqueda de candidatos a vacuna para el control de la criptosporidiosis.

A mis amigos del alma, gracias por estar ahí.

A la Universidad, gracias por apoyarme en esta oportunidad. A todos los veterinarios, médicos y bacteriólogos que me ayudaron en la consecución de las muestras, mil gracias porque definitivamente su ayuda fue vital en el proceso.

Y finalmente, gracias a todos los que no mencioné pero que de una u otra manera contribuyeron en la terminación de este proyecto.



## Financiación

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con fondos del Gobierno de Aragón (grupo de investigación consolidado con referencia B82) y del Ministerio de Economía y Competitividad de España (proyecto de investigación AGL2012-32138)

Una parte de este trabajo de investigación ha sido publicado en el siguiente artículo:

Avendaño, C., Ramo, A., Vergara-Castiblanco, C., Sánchez-Acedo, C., Quílez, J. (2018). Genetic uniqueness of *Cryptosporidium parvum* from dairy calves in Colombia. *Parasitology Research*. En prensa. DOI: 10.1007/s00436-018-5818-6



## ÍNDICE

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>37</b>
<hr/>	
<b>1 DATOS GEOGRÁFICOS E INDICADORES ECONÓMICOS Y SANITARIOS DE COLOMBIA</b>	<b>39</b>
<b>2 BIOLOGÍA GENERAL DE <i>Cryptosporidium</i> spp.</b>	<b>42</b>
2.1 ALGUNOS ASPECTOS HISTÓRICOS	42
2.2 TAXONOMÍA Y ESPECIACIÓN	43
2.3 CICLO BIOLÓGICO	49
<b>3 PATOGENIA Y FACTORES DE VIRULENCIA</b>	<b>54</b>
<b>4 RESPUESTA INMUNE</b>	<b>59</b>
4.1 INMUNIDAD INNATA	59
4.2 INMUNIDAD ADQUIRIDA	60
<b>5 CUADRO CLINICO</b>	<b>64</b>
5.1 GANADO VACUNO	64
5.2 GANADO PORCINO	66
5.3 HUMANOS	67
<b>6 DIAGNÓSTICO</b>	<b>69</b>
6.1 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	69
6.2 DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO	70
6.2.1 Recogida y conservación de muestras	70
6.2.2 Técnicas de concentración	70
6.2.3 Técnicas de tinción	71
6.2.4 Técnicas inmunológicas	74

<b>6.3</b>	<b>SERODIAGNÓSTICO</b>	<b>75</b>
<b>6.4</b>	<b>DIAGNÓSTICO MOLECULAR</b>	<b>76</b>
6.4.1	Identificación de especies de <i>Cryptosporidium</i>	77
6.4.2	Identificación de subtipos de <i>Cryptosporidium</i>	78
<b>7</b>	<b>ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS</b>	<b>80</b>
<b>7.1</b>	<b>VÍAS DE TRANSMISIÓN Y FACTORES DE RIESGO</b>	<b>80</b>
7.1.1	Ganado vacuno	83
7.1.2	Ganado porcino	86
7.1.3	Humanos	87
<b>7.2</b>	<b>EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>88</b>
7.2.1	Ganado vacuno	88
7.2.2	Ganado porcino	96
7.2.3	Humanos	98
<b>8</b>	<b>CONTROL</b>	<b>107</b>
<b>8.1</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>107</b>
<b>8.2</b>	<b>INMUNOPREVENCIÓN</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>ASPECTOS DE LA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE <i>Giardia duodenalis</i> EN HUMANOS</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACION SOBRE <i>Cryptosporidium</i> Y <i>Giardia</i> EN HUMANOS Y ANIMALES EN COLOMBIA</b>	<b>115</b>
	<b>OBJETIVO 1. INVESTIGAR LA PRESENCIA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS DE <i>Cryptosporidium</i> EN GANADO VACUNO, GANADO PORCINO Y POBLACIÓN HUMANA DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA</b>	<b>119</b>
<b>1</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>121</b>
<b>1.1</b>	<b>OBTENCIÓN Y ORIGEN DE LAS MUESTRAS FECALES</b>	<b>123</b>
1.1.1	Ganado vacuno	123
1.1.2	Ganado porcino	127
1.1.3	Humanos	128
<b>1.2</b>	<b>IDENTIFICACIÓN DE OOQUISTES DE <i>Cryptosporidium</i></b>	<b>131</b>
<b>1.3</b>	<b>ESTUDIO MOLECULAR</b>	<b>132</b>
1.3.1	Extracción de ADN	132

1.3.2	Identificación de especies de <i>Cryptosporidium</i>	132
1.3.3	Identificación de subtipos de <i>C. parvum</i> y <i>C. hominis</i>	135
1.3.4	Estudio multilocus con diversos minisatélites y microsatélites	137
1.3.5	Estudio de la diversidad genética de los aislados de <i>Giardia</i>	144
<b>1.4</b>	<b>ESTUDIO ESTADÍSTICO</b>	<b>145</b>
<b>2</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>147</b>
<b>2.1</b>	<b>GANADO VACUNO</b>	<b>149</b>
2.1.1	Estudio microscópico	149
2.1.2	Estudio molecular	153
<b>2.2</b>	<b>GANADO PORCINO</b>	<b>162</b>
<b>2.3</b>	<b>HUMANOS</b>	<b>166</b>
2.3.1	Estudio microscópico	166
2.3.2	Estudio molecular	171
<b>3</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>181</b>
<b>3.1</b>	<b>GANADO VACUNO</b>	<b>183</b>
<b>3.2</b>	<b>GANADO PORCINO</b>	<b>191</b>
<b>3.3</b>	<b>HUMANOS</b>	<b>194</b>
<b>OBJETIVO 2. EVALUAR LA UTILIDAD DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS DE <i>Cryptosporidium parvum</i> EN LA INMUNIZACIÓN FRENTE A LA CRIPTOSPORIDIOSIS</b>		<b>201</b>
<b>1</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>203</b>
<b>1.1</b>	<b>SELECCIÓN Y SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS</b>	<b>205</b>
<b>1.2</b>	<b>DINÁMICA DE ANTICUERPOS FRENTE A LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN RATONES</b>	<b>210</b>
1.2.1	Protocolo de inoculación	212
1.2.2	Detección de anticuerpos	213
1.2.3	Análisis estadístico	213
<b>1.3</b>	<b>PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACIÓN “in vitro”</b>	<b>214</b>
1.3.1	Protocolo de inoculación	214
1.3.2	Cultivo de <i>C. parvum</i>	216
1.3.3	PCR semicuantitativa	216
<b>2</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>219</b>



<b>2.1</b>	<b>DINÁMICA DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS CP15, CSL Y P23 DE <i>C. parvum</i></b>	<b>221</b>
<b>2.2</b>	<b>CAPACIDAD DE SERONEUTRALIZACIÓN <i>in vitro</i> DE LOS ANTICUERPOS</b>	<b>224</b>
<b>2.3</b>	<b>EFFECTOS ADVERSOS</b>	<b>225</b>
2.3.1	Piel	225
2.3.2	Riñón	228
2.3.3	Hígado	231
2.3.4	Rayos x	232
<b>3</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>235</b>
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>243</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>247</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>253</b>



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Especies de <i>Cryptosporidium</i> descritas en mamíferos.....	47
Tabla 2 Factores de virulencia de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	56
Tabla 3 Sensibilidad y especificidad de algunas tinciones usadas para la identificación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> .....	72
Tabla 4 Sensibilidad y especificidad de algunas pruebas inmunológicas para la identificación de antígenos de <i>Cryptosporidium</i> .....	74
Tabla 5 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> y especies identificadas en ganado vacuno en diversos países.....	89
Tabla 6 Subtipos de <i>C. parvum</i> identificados en ganado vacuno en diversos países..	93
Tabla 7 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> y especies identificadas en ganado porcino en diversos países.....	97
Tabla 8 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> y especies identificadas en humanos en diversos países.....	99
Tabla 9 Subtipos de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i> identificadas en humanos en diversos países.....	102
Tabla 10 Fármacos aprobados para el tratamiento de la criptosporidiosis en humanos por la Administración para los Alimentos y Medicamentos de los EEUU (FDA).....	109
Tabla 11 Antígenos de <i>Cryptosporidium</i> estudiados como candidatos para elaborar una vacuna frente a la criptosporidiosis.....	111
Tabla 12 Genotipos multilocus (GMLs) del ensamblaje A de <i>G. duodenalis</i> .....	115
Tabla 13 Número de terneros analizados y explotaciones de origen en diferentes Departamentos de Colombia .....	124
Tabla 14 Número de cerdos analizados y explotaciones de origen en diferentes Departamentos de Colombia .....	128
Tabla 15 Procedencia de las muestras fecales de origen humano utilizadas en el estudio epidemiológico .....	130
Tabla 16 Cebadores utilizados en la identificación de especies de <i>Cryptosporidium</i>	134
Tabla 17 Cebadores utilizados en la identificación de subtipos de <i>Cryptosporidium</i> .	135

Tabla 18 Cebadores y condiciones utilizadas en las reacciones de PCR para la amplificación de diversos microsatélites y minisatélites .....	142
Tabla 19 Cebadores y condiciones utilizadas en las reacciones de PCR para la identificación de especies y ensamblajes de <i>Giardia</i> .....	146
Tabla 20 Número de terneros parasitados por <i>Cryptosporidium</i> en tres Departamentos de Colombia según el estudio microscópico de muestras fecales.....	150
Tabla 21 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> en terneros lactantes de acuerdo con la edad y presencia de diarrea .....	151
Tabla 22 Intensidad de la infección por <i>Cryptosporidium</i> en terneros lactantes según la presencia de diarrea y la edad.....	152
Tabla 23 Distribución de subtipos GP60 de <i>C. parvum</i> en terneros menores de 35 días en explotaciones lecheras de diferentes municipios de Colombia.....	153
Tabla 24 Alelos de diferentes microsatélites y minisatélites identificados mediante electroforesis capilar en aislados de <i>C. parvum</i> de terneros en Colombia .....	156
Tabla 25 Subtipos multilocus (MLTs) identificados entre aislados de <i>C. parvum</i> de terneros en Colombia .....	159
Tabla 26 Análisis de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en terneros en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST .....	160
Tabla 27 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> en ganado porcino según la edad y presencia de diarrea .....	163
Tabla 28 Prevalencia y distribución de parásitos gastrointestinales en ganado porcino .....	165
Tabla 29 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> en humanos de acuerdo con la procedencia de las muestras y la presencia de diarrea.....	166
Tabla 30 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> en humanos de acuerdo con la región de origen de las muestras y la presencia de diarrea .....	167
Tabla 31 Prevalencia de diversos parásitos gastrointestinales en muestras fecales de 307 personas.....	169
Tabla 32 Prevalencia de parásitos gastrointestinales en muestras fecales de 307 personas según la región de origen y presencia de diarrea .....	169
Tabla 33 Presencia de parásitos gastrointestinales en muestras fecales humanas según grupos de edad .....	170
Tabla 34 Especies de <i>Cryptosporidium</i> y alelos de tres locus (GP60 y dos microsatélites) identificados en aislados de origen humano en Colombia .....	173
Tabla 35 Subtipos multilocus (MLTs) identificados entre aislados de <i>C. parvum</i> y <i>C. hominis</i> de humanos en Colombia.....	175

Tabla 36 Análisis de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en humanos en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST .....	175
Tabla 37 Ensamblajes y subensamblajes identificados en diferentes aislados de <i>Giardia duodenalis</i> de origen humano en Colombia.....	178
Tabla 38 Determinantes antigénicos analizados en la proteína P23 .....	206
Tabla 39 Determinantes antigénicos analizados en la proteína CSL .....	207
Tabla 40 Determinantes antigénicos analizados en la proteína CP15.....	208
Tabla 41 Descripción de los péptidos seleccionados para el presente trabajo.....	209
Tabla 42: Grupos de ratones para evaluar la dinámica de anticuerpos producidos frente a diferentes péptidos .....	210
Tabla 43: Grupos de ratones para evaluar la capacidad de seroneutralización de anticuerpos producidos frente a diferentes péptidos .....	215
Tabla 44: Porcentaje de ratones con diferentes grados de lesión en la piel.....	227
Tabla 45 Porcentaje de ratones con diferentes grados de nefritis.....	229
Tabla 46: Porcentaje de ratones con algún tipo de lesión en hígado .....	232



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa Colombia, división político-administrativa.....	40
Figura 2 Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	50
Figura 3 Propuesta del ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> en el ambiente en ausencia de célula hospedadora (ej. biofilm) o en ambiente extracelular (ej. lumen) .....	54
Figura 4 Respuesta inmune generada frente a las proteínas de los esporozoitos de <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	63
Figura 5 Tinción de Heine. Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. procedentes de las heces un ternero.....	73
Figura 6 Tinción de Ziehl Neelsen. Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. procedentes de las heces de un ternero .....	73
Figura 7 Inmunofluorescencia directa. Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. procedentes de las heces de un ternero .....	75
Figura 8 Principales vías de transmisión de <i>C. hominis</i> .....	82
Figura 9 Principales vías de transmisión de <i>C. parvum</i> .....	82
Figura 10 Dinámica de la eliminación de <i>C. parvum</i> .....	84
Figura 11 Modelo que describe la dinámica de infección por <i>C. parvum</i> en terneros lactantes .....	85
Figura 12 Distribución de las familias GP60 identificadas en aislados de <i>C. parvum</i> de ganado vacuno en diferentes países .....	93
Figura 13 Distribución continental de los subtipos de <i>C. parvum</i> más prevalentes en ganado vacuno en diversas zonas del planeta .....	96
Figura 14 Distribución de las familias GP60 identificadas en aislados de <i>C. hominis</i> de humanos en diversos países .....	106
Figura 15 Distribución de las familias GP60 identificadas en aislados de <i>C. parvum</i> de humanos en diversos países .....	106
Figura 16 Distribución continental de los subtipos de <i>C. parvum</i> y <i>C. hominis</i> más prevalentes en humanos en diversas zonas del planeta.....	107
Figura 17 Mapa de Colombia que muestra la distribución de las explotaciones bovinas muestreadas.....	123
Figura 18 Mapa de Cundinamarca. División político – administrativa.....	125

Figura 19 Mapa de Boyacá. División político – administrativa.....	126
Figura 20 Mapa de Antioquia. División político – administrativa.....	126
Figura 21 Mapa de Colombia que muestra la distribución de las explotaciones porcinas muestreadas.....	127
Figura 22 Mapa de Valle del Cauca. División político – administrativa.....	129
Figura 23 Mapa de Nariño. División político – administrativa .....	129
Figura 24 Mapa de Colombia: zonas de procedencia de las muestras humanas.....	130
Figura 25 Análisis de fragmentos de diversos microsatélites y minisatélites. Electroferograma donde se observa la asignación de alelos .....	138
Figura 26 Análisis de fragmentos. Electroferogramas indicativos de infecciones mixtas por dos alelos en los loci TP14 y MSB.....	139
Figura 27 Análisis filogenético de los aislados identificados en el presente estudio y diferentes subtipos de <i>C. parvum</i> depositados en GenBank.....	155
Figura 28 Diagrama de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en terneros en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST .....	161
Figura 29 Análisis bayesiano de la estructura genética de aislados de <i>C. parvum</i> ....	162
Figura 30 Distribución de los parásitos identificados en el total de muestras positivas .....	165
Figura 31 Distribución de parásitos gastroentéricos identificados en heces de humanos sobre el total de muestras positivas.....	171
Figura 32 Diagrama de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en humanos en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST .....	176
Figura 33 Estudio filogenético de los aislados de <i>G. duodenalis</i> identificados en este trabajo y aislados de referencia de GenBank del gen $\beta$ -giardina .....	179
Figura 34 Estudio filogenético de los aislados de <i>G. duodenalis</i> identificados en este trabajo y aislados de referencia de GenBank del gen <i>tpi</i> .....	180
Figura 35 Alineamiento de la proteína P23 .....	206
Figura 36 Predicción de la afinidad antigénica de la proteína P23 .....	206
Figura 37 Alineamiento de la proteína CSL.....	207
Figura 38 Predicción de la afinidad antigénica de la proteína CSL .....	207
Figura 39 Alineamiento de la proteína CP15.....	208
Figura 40 Predicción de la afinidad antigénica de la proteína CP15 .....	208



Figura 41 Absorbancias obtenidas en cada uno de los grupos tratados con la formulación a base de péptido más FIS y adyuvante de Freund.....	222
Figura 42 Porcentajes de ratones con título positivo para cada uno de los grupos inoculados con diferentes péptidos más FIS y adyuvante.....	223
Figura 43 Porcentaje de ratones con título positivo para cada uno de los grupos inoculados con los diferentes péptidos con adyuvante, pero sin FIS como inmunoestimulante.....	223
Figura 44 Pruebas de seroneutralización <i>in vitro</i> con anticuerpos obtenidos en ratones inoculados con diversos péptidos sintéticos de <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	224
Figura 45 Inflamación postinoculación observada en la piel de un ratón inoculado con un péptido sintético de <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	226
Figura 46 Lesiones observadas en la piel de ratones inoculados con diferentes péptidos sintéticos de <i>C. parvum</i> .....	228
Figura 47 Lesiones observadas en el riñón de ratones inoculados con diferentes péptidos sintéticos de <i>C. parvum</i> .....	230
Figura 48 Número de animales que presentaron infiltrado inflamatorio mononuclear en el riñón.....	230
Figura 49 Lesiones observadas en el hígado de ratones inoculados con diferentes péptidos sintéticos de <i>C. parvum</i> .....	231
Figura 50 Radiografía de los ratones inoculados con la formulación del péptido + solución salina 0.9% .....	233
Figura 51 Radiografía de los ratones inoculados con la formulación del péptido + adyuvante de Freund .....	233



# RESUMEN

---



En el presente trabajo se han investigado algunos aspectos de la epidemiología y el control de la criptosporidiosis en diversas regiones de Colombia. En un primer objetivo se estudió la presencia y diversidad genética de *Cryptosporidium* en muestras de origen humano y animal y se investigó su relación con diversas variables relacionadas con el hospedador como la edad, presencia de diarrea o procedencia geográfica. Para ello se analizaron muestras fecales de origen humano (663 individuos menores de 19 años), ganado vacuno (432 terneros menores de 35 días procedentes de 74 explotaciones) y ganado porcino (233 cerdos de diferentes fases de crianza procedentes de 19 explotaciones). En todas las muestras se identificó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* mediante técnicas microscópicas como la tinción negativa de Heine (muestras de terneros) o la tinción de Ziehl-Neelsen modificada previa concentración por sedimentación (muestras de origen humano y porcino), seleccionando las que resultaron positivas para llevar a cabo su estudio molecular.

En las muestras positivas se extrajo en primer lugar el ADN del parásito y se procedió a la amplificación por PCR y posterior análisis (restricción enzimática, secuenciación) de diversos marcadores para identificar la especie (gen SSu-rRNA) y subtipo (gen GP60) de *Cryptosporidium*. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de fragmentos multilocus con cinco microsatélites (ML1, ML2, TP14, 5B12, CP47) y cuatro minisatélites (MSB, MSC6-7, cgd2\_3850, cgd6\_5400). El estudio molecular se hizo extensivo a los aislados de *Giardia* identificados en las muestras de origen humano, en los que se identificó la especie y ensamblaje mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación de los genes ssu-rRNA,  $\beta$ -giardina y triosa fosfato isomerasa.

El análisis microscópico permitió identificar ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de 115 terneros (26,6%) pertenecientes a 44 explotaciones (59,5%). La infección fue diagnosticada en terneros de 3 a 35 días de edad, aunque la prevalencia fue significativamente mayor en los de 8 – 14 días (40,7%). Los terneros menores de 21 días tenían hasta 4,3 veces más posibilidades de estar infectados que los mayores de 21 días, lo cual confirma que el riesgo de estar infectado está estrechamente asociado con la edad. Análogamente, la probabilidad de padecer diarrea se incrementó hasta 7 veces en los terneros parasitados en comparación con los no parasitados. La mayoría de aislados de origen bovino caracterizados a nivel molecular (71/73) fueron identificados como *C. parvum* y asignados a ocho subtipos de la familia Ila, con claro predominio de una variante no descrita previamente en la bibliografía

científica (IIaA18G5R1). El estudio multilocus reveló una diversidad genética moderada (22 subtipos multilocus = SML) y una estructura de poblaciones predominantemente panmíctica. La mayoría de SMLs fueron únicos y distintivos de determinadas explotaciones bovinas.

La infección por *Cryptosporidium* fue mucho menos prevalente en ganado porcino, puesto que únicamente se identificaron ooquistes en 15 animales (6,4%) de 7 explotaciones, aunque este hallazgo constituye la primera denuncia de este protozoo en cerdos en Colombia. La infección fue más frecuente en animales en la etapa de precebo (21-63 días) (14,9%) y no estuvo asociada estadísticamente con la presencia de diarrea. El análisis molecular únicamente proporcionó un resultado positivo en dos aislados que fueron identificados como *C. parvum*.

El estudio coprológico en población humana confirmó la infección por *Cryptosporidium* en 42 personas (6,3%), siendo más frecuente en niños procedentes de colegios (10,7%) que en muestras de origen hospitalario, así como en individuos de procedencia rural (12%) en comparación con los de origen urbano. *C. parvum* fue la especie identificada en la mayoría aislados correctamente caracterizados (32/34), siendo *C. hominis* muy poco prevalente. Cabe destacar el alto porcentaje de portadores asintomáticos y la escasa diversidad genética de ambas especies en el locus GP60, ya que todos los aislados fueron asignados al mismo alelo (*C. parvum*: 351pb; *C. hominis*: 384 pb). El estudio multilocus fue realizado con base a la combinación del locus GP60 y los dos únicos microsatélites que amplificaron de manera regular en la mayoría de aislados (TP14, MSB) y reveló cinco MLTs, tres en *C. parvum* y dos en *C. hominis*. El estudio molecular también se pudo realizar con 20 aislados de *Giardia duodenalis* de origen humano, que fueron asignados a los ensamblajes/subensamblajes B (n: 11), A (n: 2) y All (n: 7).

En un segundo objetivo del trabajo de investigación se utilizó un modelo experimental de ratones con el fin estudiar la capacidad de diversos péptidos sintéticos de *C. parvum* para estimular la producción de anticuerpos neutralizantes y valorar su utilidad como candidatos para una vacuna frente a la criptosporidiosis. Para ello se diseñaron *in silico* y sintetizaron un total de siete péptidos derivados de tres proteínas de *C. parvum* (P23, CP15 y CSL), que fueron inoculados en diversos grupos de ratones siguiendo un protocolo establecido. La producción de anticuerpos séricos en los ratones inoculados fue analizada mediante una técnica ELISA y su capacidad

neutralizante fue investigada mediante amplificación por PCR del extracto de cultivos celulares inoculados con ooquistes incubados con el suero de los diferentes grupos experimentales.

Los siete péptidos sintetizados estimularon la producción de anticuerpos en los ratones, especialmente cuando eran inoculados con un inmunoestimulante (FIS) y adyuvante. Las mejores respuestas se observaron en los animales inoculados con cuatro péptidos, dos derivados de la proteína CSL y otros dos derivados de la proteína CP15-1, aunque sólo estos últimos mostraron la capacidad de bloquear la infección de las células por parte de los esporozoítos de *C. parvum*, por lo que podrían considerarse candidatos para una vacuna frente a la criptosporidiosis. Las lesiones tisulares que se observaron en algunos ratones inoculados fueron consecuencia de la formulación utilizada y no del péptido, por lo que se aconseja utilizar adyuvantes menos nocivos en posteriores investigaciones.





# **INTRODUCCIÓN y OBJETIVOS**

---



La criptosporidiosis es una de las protozoosis intestinales más frecuentes en humanos y animales en todo el mundo. Los parásitos del género *Cryptosporidium*, causantes de esta enfermedad, ocasionan cuadros gastrointestinales que afectan anualmente a millones de personas, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo. La criptosporidiosis presenta además implicaciones en salud pública derivadas del carácter zoonótico de algunas especies y genotipos de *Cryptosporidium*, que pueden transmitirse al hombre a partir de diversas especies animales. Por todo ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera como enfermedad emergente y su elevada morbilidad, mortalidad e implicaciones socioeconómicas que la relacionan con las comunidades más pobres del planeta fueron reconocidas por dicho organismo al incluirla en la “Iniciativa de Enfermedades Olvidadas”.

Las causas que justifican la elevada prevalencia de *Cryptosporidium* son diversas. Su transmisión tiene lugar mediante la ingestión de ooquistes, estadios infectantes de pequeño tamaño que se eliminan en grandes cantidades en las heces durante la fase aguda de la infección y son extraordinariamente resistentes en el ambiente y a numerosos desinfectantes. Asimismo, cabe destacar la baja dosis infectante y la posibilidad de transmisión por vías como la ingestión de alimentos y especialmente agua contaminada. De hecho, *Cryptosporidium* fue uno de los protozoos más prevalentes en brotes de origen hídrico en humanos registrados entre 2004 y 2010 en Europa, Norteamérica o Australia, por lo que la OMS lo considera un patógeno de referencia indicativo de la calidad del agua. La transmisión interhumana justifica su elevada frecuencia en instituciones como colegios o guarderías, donde frecuentemente ocasiona brotes diarreicos.

*Cryptosporidium* pueden infectar a un amplio abanico de especies animales, aunque es especialmente prevalente en los rumiantes domésticos, que constituyen los principales reservorios del parásito en la naturaleza. De hecho, está considerado entre los enteropatógenos más frecuentemente involucrados en la etiología del síndrome de diarrea neonatal de terneros, corderos o cabritos, una de las patologías más frecuentes en las explotaciones ganaderas que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas. Otras especies como el ganado porcino también parecen ser muy receptivos a la infección por *Cryptosporidium* y se consideran reservorios, aunque la mayoría de las infecciones cursan en este caso de forma asintomática.

En humanos, la criptosporidiosis afecta fundamentalmente a dos grupos de población, que incluyen niños de 1-9 años y pacientes inmunocomprometidos como consecuencia de infecciones (VIH+/SIDA), recepción de trasplantes o tratamientos con fármacos inmunosupresores. En el primer grupo, la enfermedad se manifiesta con un cuadro de gastroenteritis aguda autolimitante, con diarrea, náuseas, vómitos y pérdida de peso, mientras que en pacientes en fases de inmunodepresión profunda puede ocasionar un cuadro de diarrea incoercible, prolongada y en ocasiones mortal. De hecho, la ausencia de un tratamiento farmacológico eficaz o vacunas para su prevención resulta especialmente preocupante en este segundo grupo y proporciona mayor notoriedad a la criptosporidiosis frente a otras causas de enteritis.

Uno de los aspectos que ha suscitado mayor interés entre la comunidad científica durante los últimos años en la investigación de este microorganismo hace referencia a su diversidad inter- e intraespecífica, cuyo conocimiento es imprescindible para determinar la especificidad de hospedador de los aislados, conocer las vías de transmisión de la enfermedad y esclarecer los vínculos entre las infecciones en humanos y animales. De hecho, desde finales de la década de 1990 se han desarrollado numerosas herramientas de biología molecular que han demostrado que *Cryptosporidium* está constituido por un complejo de especies genéticamente distintas y aisladas reproductivamente, pero cuyos oo/quistes son morfológicamente idénticos e indistinguibles mediante técnicas microscópicas o inmunológicas.

La infección por *Cryptosporidium* está descrita en prácticamente todo el mundo, aunque las publicaciones realizadas en Sudamérica son escasas. La enfermedad parece ser prevalente en niños y pacientes inmunodeprimidos, según algunos estudios realizados en Brasil, Venezuela, Argentina o Chile, donde la criptosporidiosis está considerada como un problema de salud pública. Los protozoos del género *Cryptosporidium* también han sido descritos como causa de diarrea neonatal en terneros en estos países y se ha denunciado su presencia en muestras de agua y alimentos. En Colombia, la infección fue denunciada por primera vez en 1988 a partir de muestras fecales de niños con diarrea residentes en el Departamento de Antioquia. Posteriormente se han realizado algunos estudios en humanos y terneros en los Departamentos del Valle del Cauca, Antioquía, Meta, Santander, Caldas, Boyacá y Cundinamarca. Sin embargo, la información sigue siendo muy limitada y los estudios de biología molecular para conocer las especies y subtipos de *Cryptosporidium* circulantes en humanos y animales en Colombia son prácticamente inexistentes.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo general profundizar en el conocimiento de la epidemiología y el control de la criptosporidiosis en humanos y animales en diferentes Departamentos de Colombia, utilizando para ello técnicas microscópicas y moleculares, junto con un modelo experimental de ratones en el que investigar diversos péptidos de *C. parvum* diseñados *in silico* como candidatos para una vacuna frente a la enfermedad. Los objetivos específicos que nos hemos fijado son:

1. Investigar la presencia y diversidad genética de los aislados de *Cryptosporidium* en ganado vacuno, ganado porcino y población humana de diferentes regiones de Colombia.

2. Evaluar la utilidad de péptidos sintéticos de *Cryptosporidium parvum* en la inmunización frente a la criptosporidiosis.



# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---





## **1 DATOS GEOGRÁFICOS E INDICADORES ECONÓMICOS Y SANITARIOS DE COLOMBIA**

La República de Colombia se localiza al noroeste del continente de América del Sur. Al norte limita con la República de Panamá y el mar Caribe, por el Oriente con las Repúblicas de Venezuela y Brasil, por el sur con las Repúblicas de Perú y Ecuador, y por el occidente con el océano Pacífico (Subgerencia Cultural del Banco de la República, 2015). De acuerdo con la Constitución Política de 1991, el territorio colombiano administrativamente se configura en 32 departamentos o entes territoriales, divididos a su vez en municipios cuyo régimen político está a cargo de la capital del departamento (Gobernación de Cundinamarca. Secretaria de salud., 2013). Colombia cuenta con seis grandes regiones: Andina, Caribe, Pacífica, Orinoquía, Amazonía e Insular (Subgerencia Cultural del Banco de la República., 2015) (Figura 1)

Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) el censo nacional oficial realizado en 2005 indicó una población de 41.468.384 personas, de las cuales el 51% eran mujeres, con un promedio de personas por hogar de 3,9. Una gran parte de las viviendas cuenta con los servicios básicos de electricidad, agua y alcantarillado (93,6%, 83,4% y 73,1% respectivamente) (Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE, 2010). En el año 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registra una población de 48.321.000 personas, con una edad media de 28 años y expectativas de vida de 75 años para los hombres y 81 para las mujeres. El 76% del total de la población vive en zonas urbanas (World Health Organization, 2015).

La notificación de eventos de interés en salud pública se registra en el Boletín Epidemiológico Semanal (BES), publicación del Instituto Nacional de Salud. Esta información es enviada por las Entidades Territoriales departamentales y distritales al Instituto Nacional de Salud cada miércoles, donde es analizada por los referentes del nivel nacional para ser publicada durante la semana siguiente y poder utilizarse para la toma de decisiones a nivel nacional. En ella se incluyen diferentes causas de mortalidad infantil, que según la OMS incluyen las anomalías congénitas, prematuridad, infección respiratoria aguda, asfixia al nacimiento, sepsis neonatal, heridas, diarrea, VIH/SIDA, malaria y sarampión (World Health Organization, 2015).

La enfermedad diarreica aguda (EDA) se registra como una de las principales causas de mortalidad en niños menores de 5 años. En Colombia, durante 2016 se notificaron 3.368.992 casos de esta patología. En ese mismo año, la tasa de mortalidad nacional por EDA en menores de 5 años fue de 30,7 casos por 1.000.000 (Instituto Nacional de Salud - Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública, 2016).

**Figura 1 Mapa Colombia, división político-administrativa**



**Tomada de:** Instituto Geográfico Agustín Codazzi (2012).

Por lo que respecta a la economía, la ganadería bovina constituye la principal actividad agropecuaria del país y la de mayor presencia en el entorno rural colombiano, siendo responsable del 53% del Producto Interno Bruto pecuario, 19,5% del producto agropecuario y 1,3% del PIB nacional. En efecto, hay ganadería en todas

las regiones y todos los pisos térmicos, en todas las escalas de producción, desde el minifundio lechero hasta la ganadería empresarial y la hay también en diversas especialidades: la cría (periodo transcurrido hasta el destete de los animales), el levante (entre el destete y la ceba), la ceba o engorde, la llamada lechería especializada y un gran componente de doble propósito (ganadería criada para producir carne y leche) (FEDEGAN, 2014).

En el año 2014, la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN) registra un inventario de 22.593.282 cabezas de ganado bovino, de las cuales 12.516.695 eran hembras mayores de 1 año y 3.921.046 terneros. El 6,4% del censo nacional está orientado a lechería especializada, el 19,9% incluye animales de cebo, el 38,8% bovinos de cría y el 35% restante a animales de doble propósito (FEDEGAN, 2014).

La producción porcina es comparativamente menos importante. El censo nacional del año 2015 recoge una población de 4.610.453 cerdos distribuidos en 201.098 explotaciones. La mayoría de granjas se localizan en los departamentos de Antioquia (35,54%), Cundinamarca (10,60%) y Valle del Cauca (9,04%), mientras que el porcentaje restante se distribuye por el resto del territorio (Instituto Colombiano Agropecuario. ICA, 2015)

En relación con la salud animal, la entidad encargada de diseñar y ejecutar estrategias para prevenir, controlar y reducir riesgos sanitarios, biológicos y químicos que puedan afectar la producción agropecuaria es el Instituto Colombiano Agropecuario – ICA. Este organismo clasifica las enfermedades en función de si están ó no sujetas a control oficial. En el primer grupo se incluyen patologías como la fiebre aftosa, brucelosis, tuberculosis, encefalopatía espongiforme bovina y rabia bovina. La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) declaró a Colombia país libre de fiebre aftosa con vacunación y país de riesgo insignificante de encefalopatía espongiforme bovina (FEDEGAN, 2014).

Entre las patologías no sujetas a control oficial destacan enfermedades infecciosas que afectan la producción como el síndrome de diarrea neonatal (SDN), proceso de etiología multifactorial en la que además de factores individuales, de manejo y ambientales participan diferentes microorganismos (rotavirus, *Salmonella* spp., coronavirus, *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* spp.). El SDN constituye uno de las principales patologías digestivas en las explotaciones de ganado vacuno, donde

ocasiona una mortalidad en terneros neonatos que oscila entre el 3% y 30%. En Colombia, es la quinta causa de solicitud diagnóstica, resultando positivas en el laboratorio casi el 80% de las muestras fecales de los animales afectados por este síndrome. Entre las medidas recomendadas para su prevención y control se incluye el suministro de calostro durante las primeras horas de vida, aislar a los animales enfermos, vacunar a la madre gestante o al recién nacido y proporcionar buena nutrición a la madre y neonato (FEDEGAN, 2011).

## **2 BIOLOGÍA GENERAL DE *Cryptosporidium* spp.**

### **2.1 ALGUNOS ASPECTOS HISTÓRICOS**

Ernest Edward Tyzzer (1907) fue el primero en describir los estadios endógenos de un protozoo al que denominó *Cryptosporidium muris* en las glándulas gástricas de ratones de laboratorio. Transcurridos unos años, el mismo investigador identificó y denominó una segunda especie, *Cryptosporidium parvum*, mediante infecciones experimentales en ratones de laboratorio, comprobando que ésta se multiplica en el intestino delgado y forma ooquistes de menor tamaño (Tyzzer, 1912).

La implicación de *Cryptosporidium* como responsable de enfermedad gastrointestinal en humanos y animales no se reconoce por parte de la comunidad científica hasta muchos años más tarde Panciera y col. (1971) fueron los primeros en relacionar la presencia de *Cryptosporidium* en heces de terneros con cuadros de diarrea y posteriormente, Meisel y col. (1976) y Nime y col. (1976) publican los primeros casos de criptosporidiosis humana. No obstante, no es hasta la década de los años 80 cuando numerosas publicaciones confirman el papel que desempeña este protozoo como uno de los agentes etiológicos más frecuentemente implicados en la etiología del síndrome de diarrea neonatal en rumiantes (de Graaf y col., 1999).

La infección por *Cryptosporidium* adquiere gran trascendencia en sanidad humana a partir de 1982, cuando se inicia la pandemia de SIDA y se confirma su papel oportunista como causante de procesos diarreicos potencialmente mortales en pacientes inmunodeprimidos (Current y col., 1983). La posterior publicación del primer gran brote de criptosporidiosis por ingestión de agua contaminada con ooquistes en la

ciudad de Milwaukee (EEUU), donde resultaron afectadas en torno a 403.000 personas, fue el punto de partida para la inclusión de esta patología como enfermedad de transmisión hídrica en todo el mundo (Mac Kenzie y col., 1994). La elevada morbilidad, mortalidad e implicaciones socioeconómicas de la criptosporidiosis fue reconocida dos décadas más tarde por la OMS, al incluirla en la “Iniciativa de Enfermedades Olvidadas” (Savioli y col., 2006).

Un dato histórico relevante estuvo marcado por la descripción del genoma de este protozoo, cuyo tamaño es de aproximadamente 9 millones de pares de bases distribuidas en 8 cromosomas (Rider y Zhu, 2010; Robinson y Chalmers, 2012). Los genomas de las dos especies más relevantes (*C. parvum*, *C. hominis*) fueron publicados en 2003 en el repositorio CryptoDB, revelando la similitud entre sus secuencias (95-97%) (Robinson y Chalmers, 2012). En 2008 se publica el genoma de una tercera especie (*C. muris*), pudiendo también observarse las semejanzas en tamaño y composición de nucleótidos con las dos anteriores (Ryan y Hijjawi, 2015).

El conocimiento del genoma de *Cryptosporidium* ha demostrado que múltiples organelas, vías metabólicas y genes propios de los Apicomplexa se encuentran reducidos o ausentes en este género, lo cual lo hace dependiente en gran medida de los nutrientes del hospedador (Wildmer y Sullivan, 2012). Por ejemplo, carece de cadena respiratoria basada en el citocromo y de genoma mitocondrial. De hecho, en *C. parvum* y *C. hominis* no hay evidencia de estructuras mitocondriales (Ryan y Hijjawi, 2015). Esta circunstancia, junto con otras que se indicarán posteriormente, justifica que *Cryptosporidium* se considere actualmente más relacionado con parásitos Gregarina primitivos que con los coccidios (Leander y col., 2003; Ryan y Hijjawi, 2015).

## 2.2 TAXONOMÍA Y ESPECIACIÓN

La correcta comprensión de la taxonomía de los microorganismos resulta decisiva para desentrañar su evolución, biología, patogenia y mecanismos de transmisión, así como identificar dianas de utilidad en su diagnóstico y tratamiento (Chalmers y Katzer, 2013). Durante muchas décadas, *Cryptosporidium* fue considerado un parásito intracelular obligado, asignado al grupo de los coccidios intestinales, considerando que únicamente era capaz de multiplicarse en una célula

hospedadora adecuada. Asimismo, se aceptaba que los ooquistes eliminados con las heces de los hospedadores infectados podían sobrevivir durante mucho tiempo en el ambiente, pero eran incapaces de multiplicarse. Sin embargo, *Cryptosporidium* siempre fue considerado un coccidio atípico, no sólo por sus características autoinfectantes, sino también por su extraña relación con la célula hospedadora que lo alberga, al ocupar una posición intracelular pero extracitoplasmática y por otros aspectos, tales como la ausencia de apicoplasto o su enorme resistencia a los antiparasitarios (Barta y Thompson, 2006).

Los datos moleculares y biológicos publicados en los últimos años han confirmado que *Cryptosporidium* está mucho más próximo a los gregarina que a los coccidios y la clasificación más reciente ha transferido este género desde la Subclase Coccidia a una nueva Subclase denominada Cryptogregarina, dentro de la Clase Gregarinomorpha (Cavalier-Smith, 2014). *Cryptosporidium* sería de momento el único representante de este taxón, cuyos miembros se caracterizan por tener localización epitelial, carecer de apicoplasto y poseer una organela alimenticia similar a la de los gregarina (Ryan y col., 2016). Entre las principales similitudes observadas al comparar *Cryptosporidium* y los gregarina se incluye su capacidad para completar el ciclo biológico en ausencia de un hospedador, la presencia de estadios extracelulares similares a gamontes, el apareamiento de estos estadios en un proceso similar a la sicigia, característica típica de los gregarina o la capacidad de modificar su estructura para adaptarse al ambiente que lo rodea (Ryan y col., 2016; Thompson y col., 2016).

Otro hallazgo de reciente descripción con importantes repercusiones en la transmisión de *Cryptosporidium* por la vía hídrica hace referencia al potencial de los biofilms acuáticos para actuar como reservorios del parásito. El biofilm no sólo actuaría como sustrato donde quedan atrapados los ooquistes, con el riesgo de que éstos se concentren y sean liberados al agua en cualquier momento, sino que proporcionaría además un ambiente rico en nutrientes donde *Cryptosporidium* puede multiplicarse y desarrollarse (Koh y col., 2013, 2014). Las evidencias acerca de la capacidad de este protozoo para desenquistarse, desarrollarse y multiplicarse en los biofilms demuestran su potencial como microorganismo de vida libre para sobrevivir y persistir en el ambiente, algo también característico de los gregarina (Clode y col., 2015).

Durante los años siguientes a la descripción del género *Cryptosporidium*, la diferenciación de especies estuvo basada en criterios aplicados a otros coccidios, tales como la especificidad de hospedador, tejidos donde se desarrollan los estadios endógenos y morfología de los ooquistes. Sin embargo, estos criterios pronto se reconocieron poco adecuados para *Cryptosporidium*, cuya especificidad de hospedador es muy variable y cuyos ooquistes son morfológicamente muy similares, puesto que únicamente se diferencian especies con ooquistes subesféricos (4-6µm de diámetro) y otras con ooquistes ovoides (5 x 7µm). La aplicación de técnicas moleculares en la década de los años 90 supuso un avance decisivo en la comprensión de la naturaleza multiespecífica de *Cryptosporidium*, por lo que en el momento actual constituyen herramientas fundamentales en la caracterización de especies de este protozoo (Plutzer y Karanis, 2009).

Los métodos moleculares más frecuentemente utilizados se basan en la existencia de diferencias en la secuencia de determinados genes del parásito, que son amplificados por técnicas de PCR y posteriormente analizados mediante secuenciación del ADN ó bien por digestión con determinadas enzimas de restricción (RFLP) (Jiang y Xiao, 2003). Entre los loci más frecuentemente utilizados cabe citar el gen que codifica la pequeña subunidad ribosomal del RNA (SSU-rRNA), así como genes que codifican determinadas proteínas de la pared ooquistica (COWP), actina o una proteína de shock térmico de 70kDa (hsp70) (Fayer, 2010).

En el momento actual se considera que la identificación y reconocimiento de nuevas especies de *Cryptosporidium* debe estar basada en una combinación de datos biológicos y genéticos. En el año 2002, durante la celebración en París del “VI Congreso sobre Epidemiología Molecular y Genética Evolutiva en Enfermedades Infecciosas”, se propusieron como herramientas básicas los siguientes: 1) estudios morfométricos de los ooquistes; 2) caracterización genética de loci comunes; 3) demostrar la existencia de especificidad de hospedadores naturales y si es posible, experimentales y 4) conformidad con las reglas de la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (Xiao y Ryan, 2004).

La adopción por la comunidad científica internacional de los criterios anteriormente señalados ha llevado a invalidar especies anteriormente reconocidas como tales. Algunas han sido consideradas *nomen nudum*, al no disponer de detalles descriptivos suficientes para poder identificarlas correctamente. Es el caso de *C.*

*ameivae*, *C. anserinum*, *C. nasorum* o *C. tyzzeri*. Otras especies no fueron identificadas correctamente y están actualmente incluidas en el género *Sarcocystis*, como *C. crotali* o *C. vulpis* (Fayer, 2008, 2010).

Siguiendo los criterios mencionados anteriormente, durante la última década se ha incrementado considerablemente el número de especies de *Cryptosporidium*, habiéndose descrito en torno a una especie nueva por año entre 2004 y 2013. En el momento actual, se reconocen 31 especies válidas, de las cuales 21 tienen la capacidad de infectar mamíferos y desarrollan su ciclo biológico en células del epitelio intestinal, exceptuando dos de localización gástrica que forman ooquistes ovoides e infectan principalmente a roedores (*C. muris*) y ganado vacuno (*C. andersoni*) (Chalmers y Katzer, 2013; Chalmers, 2014; Ryan y col., 2016) (Tabla 1). Dos especies son las más importantes desde el punto de vista de Salud Pública, ya que ocasionan la mayoría de casos esporádicos y brotes de la enfermedad en humanos: *C. parvum* y *C. hominis*. No obstante, otras han sido descritas esporádicamente en personas, tales como *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum* o *C. suis* (Xiao, 2010; Chalmers y col., 2011; Li y col., 2014).

*C. parvum* es la especie más ampliamente difundida en mamíferos, habiendo sido descrita en más de 150 hospedadores (Xiao y Feng, 2008). Los estudios epidemiológicos han demostrado que se mantiene en la naturaleza mediante dos ciclos de transmisión, zoonótico y antroponótico, siendo la más frecuente en humanos en países industrializados. *C. hominis* es morfológicamente indistinguible de la anterior, pero ha sido descrita casi exclusivamente en el hombre y su transmisión es por tanto eminentemente antroponótica. Esta última se considera la especie más prevalente en humanos en países en vías de desarrollo y comparte el 97% de su genoma con *C. parvum* (Xiao y Ryan, 2004).



**Tabla 1: Especies de *Cryptosporidium* descritas en mamíferos**

Especie	Hospedador principal	Tamaño ooquistes (µm) Media/rango	Referencia	Número de acceso Genbank gen 18SSU rRNA
<i>C. andersoni</i>	Vaca ( <i>Bos taurus</i> )	7.4 x 5.5 / 6.0 – 8.1 x 5.0 – 6.5	Lindsay y col., 2000.	AF093496
<i>C. bovis</i>	Vaca ( <i>Bos taurus</i> )	4.9 x 4.6/4.8–5.4 x 4.2–4.8	Fayer y col., 2005.	AY741305
<i>C. canis</i>	Perro ( <i>Canis familiaris</i> )	5.0 x 4.7/3.7–5.9 x 3.7–5.9	Fayer y col., 2001.	AF112576
<i>C. cuniculus</i>	Conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) y humano ( <i>Homo sapiens</i> )	5.98 x 5.38/5.55–6.40 x 5.02–5.92	Robinson y col., 2010.	AY120901
<i>C. erinacei</i>	Erizo europeo ( <i>Erinaceus europaeus</i> )	4.9 x 4.4/4.5–5.8 x 4.0–4.8	Kvač y col., 2014.	KF612324- KF612329.
<i>C. fayeri</i>	Canguro ( <i>Macropus rufus</i> )	4.5-5.1x3.8-5.0	Ryan y col., 2008.	AF159112
<i>C. felis</i>	Gato ( <i>Felis catus</i> )	5.0 x 4.5	Iseki, 1979.	AF108862
<i>C. hominis</i>	Hombre ( <i>Homo sapiens</i> )	5.2 x 4.9/4.4–5.9 x 4.4–5.4	Morgan-Ryan y col., 2002.	AF108865
<i>C. macropodum</i>	Canguro ( <i>Macropus giganteus</i> )	4.9 x 5.4/ 4.5–6.0 x 5.0–6.0	Power y Ryan, 2008.	AF513227
<i>C. meleagridis</i>	Pavo ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	5.2 x 4.6/4.5–6.0 x 4.2–5.3	Slavin, 1955.	AF112574
<i>C. muris</i>	Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	7 x 5	Tyzzer, 1907.	AB089284
<i>C. parvum</i>	Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	≥ 4.5	Tyzzer, 1912.	AF112571
<i>C. proliferans</i>	Rata topo ( <i>Tachyoryctes splendens</i> )	6.8–8.8 x 4.8–6.2	Kvač y col., 2016.	KR090615
<i>C. ryanae</i>	Vaca ( <i>Bos taurus</i> )	2.94-4.41x2.94-3.68/3.73x 3.16	Fayer y col., 2008.	AY587166

Especie	Hospedador principal	Tamaño oocistos (µm) Media/rango	Referencia	Número de acceso Genbank gen 18SSU rRNA
<i>C. scrofarum</i>	Cerdo ( <i>Sus scrofa</i> )	5.16x4.83/4.81–5.96x4.23–5.29	Kvác y col., 2013.	JX424840
<i>C. serpentis</i>	Serpiente maicera ( <i>Elaphe guttata</i> )	2.8 - 3.6	Levine, 1980.	AF151376
<i>C. suis</i>	Cerdo ( <i>Sus scrofa</i> )	4.6 x 4.2/4.4–4.9 x 4.0–4.3	Ryan y col., 2004.	AF115377
<i>C. tyzzeri</i>	Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	4.64 x 4.19/4.39 – 4.69 x 4.13 – 4.25	Ren y col., 2012.	AF112571
<i>C. ubiquitum</i>	Oveja ( <i>Ovis aries</i> )	5.19 x 4.87/4.92–5.61x4.45–5.44	Fayer y col., 2010.	KC608024
<i>C. viatorum</i>	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	5.435x4.72/4.87–5.87x4.15–5.20	Elwin y col., 2012.	W25244
<i>C. wrairi</i>	Cobaya ( <i>Cavia porcellus</i> )	5.4 x 4.6/4.8–5.6 x 4.0–5.0	Vetterling y col., 1971.	AF115378
<i>C. xiaoi</i> (sin. <i>C. agni</i> )	Oveja ( <i>Ovis aries</i> )	2.94–4.41x2.94–4.41/3.94x3.44	Fayer y col., 2009.	FJ896053

**Modificada de:** Chalmers y Katzer (2013); Chalmers (2014); Ryan y col. (2016).

La aplicación de herramientas moleculares para investigar las especies de *Cryptosporidium* también ha conducido a la descripción de “genotipos”, término utilizado para denominar aquellos aislados en los que los datos genéticos disponibles permiten determinar la existencia de características diferenciales únicas, si bien no se posee todavía de información sobre aspectos morfométricos y biológicos para asignarles el rango de especie (Fayer y col., 2010). El reconocimiento de un nuevo genotipo tiene lugar cuando los análisis filogenéticos han eliminado la posibilidad de que esas diferencias sean debidas a la heterogeneidad entre copias de determinados genes o a variaciones intragenotípicas (Plutzer y Karanis, 2009). Según Xiao y Fayer (2008), los genotipos no tienen rango taxonómico y se consideran descriptores temporales, pero son útiles en la identificación de microorganismos genéticamente únicos para los cuales se dispone de información biológica limitada.

Siguiendo los criterios anteriormente mencionados, en las dos últimas décadas se han identificado más de 40 genotipos de *Cryptosporidium*, con base en diferencias sustanciales en la secuencia del gen que codifica la pequeña subunidad ribosomal (SSU-rRNA) y otros genes que codifican proteínas como la actina o una proteína de choque térmico con un peso de 70 kDa (Ryan y col., 2014). Los genotipos pasan a ser nueva especie cuando reúnen los requisitos básicos antes citados. De hecho, numerosas especies aceptadas en la actualidad (*C. bovis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. fayeri*, *C. macropodum*, *C. ryanae*, *C. suis*, *C. tizzery*, *C. ubiquitum*, *C. xiaoi* o *C. scrofarum*, etc) fueron consideradas inicialmente genotipos (Fayer y col., 2001; Fayer y col., 2005; Fayer, 2008; Power y Ryan, 2008; Ryan y col., 2008; Fayer y Santín, 2009; Fayer y col., 2010; Robinson y col., 2010; Ren y col., 2012; Kváč y col., 2013).

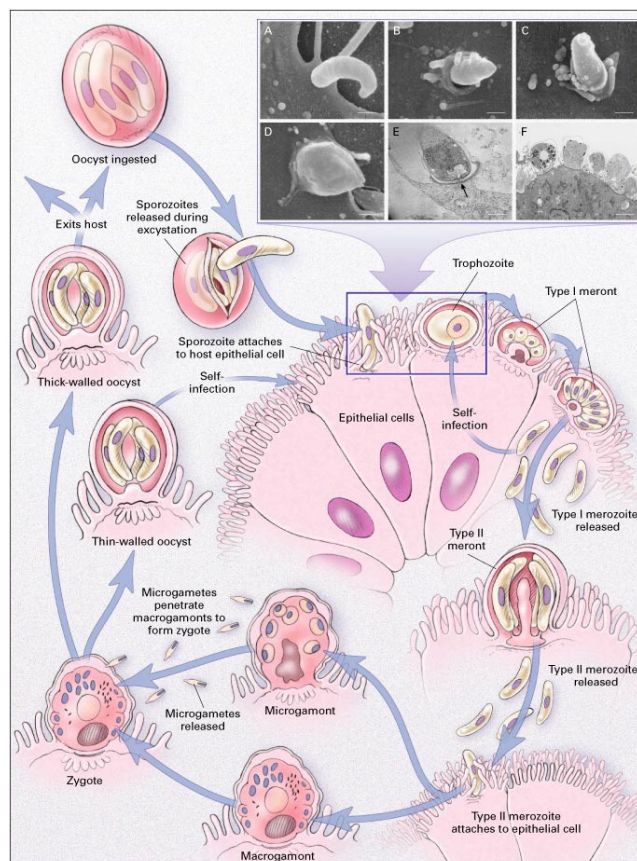
## **2.3 CICLO BIOLÓGICO**

*Cryptosporidium* tiene un ciclo biológico complejo, monoxeno, en el cual se alternan formas de reproducción sexual y asexual (Ryan y Hijjawi, 2015). En el interior de las células hospedadoras se producen dos generaciones esquizogónicas, que van seguidas de la fase sexual o gametogonia tras la cual se forman los ooquistes. La presencia de esta fase sexual permite que pueda producirse recombinación entre cepas genéticamente diferentes durante la meiosis, lo cual facilita

tanto la aparición de nuevas variantes como la adaptación del parásito a las exigencias ecológicas y condiciones epidemiológicas de una región (Cacciò y col., 2015; Cacciò y col., 2001). La recombinación genética estaría asociada con el elevado grado de polimorfismo de determinados marcadores, como el gen GP60 (Jex y col., 2008).

Una última forma de reproducción tiene lugar en el interior de los ooquistes (esporogonia o esporulación), antes de que éstos sean eliminados con las heces, lo que produce ooquistes maduros con cuatro esporozoítos haploides con capacidad infectante. Los ooquistes tienen una pared de doble capa, muy resistente y presentan en su extremo una sutura que se disuelve durante el desenquistamiento, lo cual permite la liberación de los esporozoítos (Figura 2). A diferencia de otros coccidios, los esporozoítos están desnudos dentro del ooquiste (Dubey y col., 1990).

**Figura 2** Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.



Tomada de: Cheng y col. (2002).

La infección tiene lugar cuando el hospedador ingiere ooquistes, aunque en caso de especies de localización respiratoria, como *C. baileyi* en las aves, se considera que la infección se contrae por vía inhalatoria. Los cuatro esporozoítos liberados tras el proceso de desenquistamiento se desplazan mediante movimientos de deslizamiento y flexión hasta alcanzar el borde luminal de los enterocitos. Diversos factores tales como la temperatura corporal y el efecto combinado de sales biliares y tripsina influyen en esta fase, aunque *Cryptosporidium* pueden desenquistarse *in vitro* en soluciones acuosas sin necesidad de estímulos especiales, circunstancia que justifica la posibilidad de infectar órganos extraintestinales, así como el fenómeno de autoinfección endógena (Tzipori y Ward, 2002).

Una vez liberados, los esporozoítos se desplazan mediante movimientos de deslizamiento y flexión hasta alcanzar el borde luminal de los enterocitos, invadiéndolos de forma activa tras unirse a receptores específicos situados en la superficie de las células (Wetzel y col., 2005). Posteriormente, el parásito queda alojado en el interior de la denominada vacuola parasitófora. Mediante microscopía electrónica se ha observado que este protozoo se desarrolla en el interior de la célula hospedadora, aunque en un extremo del citoplasma y separado de éste por la membrana de una organela de alimentación o fijación a través de la cual se produce la obtención de nutrientes (Barta y Thompson, 2006). La localización de la vacuola es por tanto intracelular pero extracitoplasmática, característica diferencial de los coccidios, que podría ser responsable de la reducida eficacia que presentan los fármacos frente a *Cryptosporidium* (de Graaf y col., 1999; Cacciò, 2012).

Durante el proceso de internalización, el esporozoíto adquiere forma esférica y pasa a denominarse trofozoíto. A continuación, tiene lugar la reproducción asexual mediante fases de esquizogonia o merogonia, en el curso de las cuales se forman dos tipos de esquizontes en el interior de las células parasitadas. Los esquizontes de primera generación dan lugar a la formación de 6 – 8 merozoítos tipo I, que se liberan a la luz intestinal tras la ruptura de la vacuola parasitófora y penetran en las células adyacentes, dando lugar a la formación de un nuevo esquizonte tipo I ó más frecuentemente a esquizontes de segunda generación, de cada uno de los cuales se liberan 4 merozoítos tipo II.

La penetración de los merozoítos tipo II en nuevas células y su posterior diferenciación en macrogametos (gametos femeninos) y microgametos (gametos masculinos) marca el inicio de la multiplicación sexual o gametogonia (Spano y Crisanti, 2000). Los microgametos inmaduros son similares a los esquizontes, aunque se diferencian por tener un núcleo menor y más compacto. Dicho núcleo se divide en 16 núcleos que se incorporan a la periferia del parásito y dan lugar a microgametos. Estos estadios se separan de la vacuola parasitófora por un proceso de gemación y a diferencia de los microgametos de los coccidios, no poseen flagelo ni mitocondrias (Tzipori, 1988). Los macrogametos son relativamente mayores que los otros estadios, poseen un núcleo en localización central con un nucléolo prominente, cuerpos lipídicos, gránulos de polisacáridos electrolúcidos y dos tipos de gránulos electrodensos formadores de pared (WF1 y WF2) (Fayer, 2008).

Los microgametos liberados de las células que los albergan se fijan a través de su polo apical a la superficie de la célula hospedadora parasitada por un macrogameto. Se ha observado que solo el núcleo y los microtúbulos del microgameto penetran en el este último durante la fertilización (Fayer y col., 1990). El macrogameto fertilizado o cigoto es la única fase diploide en todo el ciclo de vida del parásito (Spano y Crisanti, 2000). La formación del cigoto va seguida por la secreción de una o dos cubiertas que lo envuelven para formar el ooquiste. La cubierta exterior se desarrolla probablemente a partir de los cuerpos formadores de pared tipo I (WF1), mientras que la cubierta interna lo hace por medio de los cuerpos formadores tipo II (WF2). La ausencia de estos últimos es probablemente la causa de la existencia de ooquistes de pared fina.

El cigoto experimenta un proceso de esporogonia que da lugar a la formación de cuatro esporozoítos alargados y un cuerpo residual, configuración estructural única que proporciona el carácter taxonómico esencial para la diferenciación genérica (Current, 1985; Fayer y col., 1997). La mayoría de los ooquistes poseen pared gruesa y son eliminados al medio con las heces directamente infectantes, mientras que aquéllos que se forman en células de epitelio respiratorio son excretados en las secreciones respiratorias o nasales (O'Donoghue, 1995; Barta y Thompson, 2006). Un pequeño porcentaje de ooquistes, en torno al 20%, desarrollan una única membrana que se rompe con facilidad en la luz intestinal liberando los esporozoítos, lo que facilita la autoinfección. Por lo tanto, en ausencia de una respuesta inmunitaria protectora,

este protozoo puede mantenerse en un hospedador sin necesidad de que éste ingiera nuevos ooquistes de pared gruesa (Current y Reese, 1986).

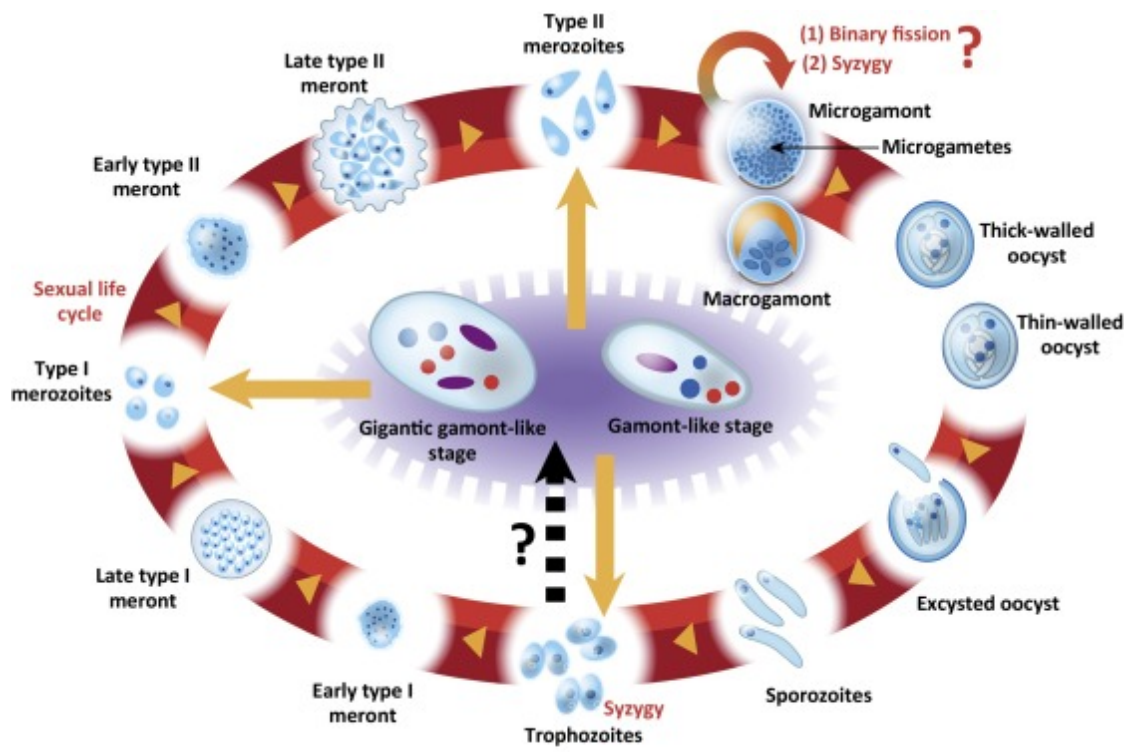
En los mamíferos, la localización primaria de *Cryptosporidium* suele ser la zona distal del intestino delgado, yeyuno e íleon principalmente, aunque en algunos casos puede parasitar todo el tracto intestinal (Sanford y Josephson, 1982). De forma ocasional se han descrito localizaciones extraintestinales como el ojo (Lindsay y col., 1987; Baskin, 1996;), conductos biliares (Fleta y col., 1995; Cimon y col., 1996; de Souza y col., 2004) o el tracto respiratorio (Fleta y col., 1995; Sánchez-Acedo y col., 1991; Mercado y col., 2007; van Zeeland y col., 2008). También se han encontrado en la superficie de las células epiteliales no ciliadas de los bronquios y en macrófagos alveolares de terneros (Mascaró y col., 1994), así como en ganglios mesentéricos y útero de ovejas (Fleta y col., 1995).

Los estudios experimentales han determinado que el periodo de prepatencia oscila entre 3-21 días y el periodo de patencia entre varios días y meses, si bien presenta variaciones en función de factores diversos, tales como la especie de hospedador y su estado inmunológico, así como la especie de *Cryptosporidium* (Egyed y col., 2003). En el hombre se estima que el periodo de prepatencia oscila entre 5 y 28 días y el periodo de patencia entre 18 y 31 días, aunque se debe tener en cuenta que la eliminación de ooquistes puede continuar intermitentemente (Jokipii y Jokipii, 1986; Fayer y col., 1990). En cuanto al tiempo de desarrollo de los distintos estadios del ciclo evolutivo, en cultivos celulares se han detectado merontes tipo I, merontes tipo II, gamontes y ooquistes a las 12, 24, 48 y 72 horas post-infección (pi), respectivamente, e incluso se han observado ooquistes a las 48 horas pi. (Palkovic y Marousek, 1989; Yang y col., 1996).

Como se ha comentado en el apartado anterior, actualmente existen evidencias sobre la posibilidad de que este protozoo pueda multiplicarse en ausencia de una célula hospedadora, habiéndose demostrado la existencia de dos estadios extracelulares únicos, similares a gamontes, que probablemente se desarrollan a partir del trofozoíto, con el propósito de producir nuevos trofozoítos o merozoítos sin necesidad de reproducción sexual (Clode y col., 2015). El papel exacto y origen de estos estadios extracelulares, así como su naturaleza y función, aún no están claras. Se considera que posibilitan la generación de ooquistes en ambientes acuáticos o libres de células hospedadoras, siendo la fisión binaria o la sicigia procesos que pueda

utilizar el parásito para incrementar su potencial reproductivo. En la Figura 3 se indica una hipótesis sobre la forma en que pueda desarrollarse este ciclo extracelular (Clode y col., 2015).

**Figura 3** Propuesta del ciclo biológico de *Cryptosporidium* en el ambiente en ausencia de célula hospedadora (ej. biofilm) o en ambiente extracelular (ej. lumen)



Trends in Parasitology

Tomada de: Clode y col. (2015).

### 3 PATOGENIA Y FACTORES DE VIRULENCIA

En la patogenia de la criptosporidiosis intervienen diversos factores, derivados tanto del efecto del parásito y sus productos sobre el epitelio intestinal, como de la respuesta inmune e inflamatoria que se produce por el daño intestinal, así como factores propios del hospedador (Chalmers, 2014). La infección puede afectar a individuos de todas las edades, aunque la prevalencia es superior en los jóvenes. Los individuos inmunocompetentes manifiestan síntomas gastrointestinales autolimitantes,



pero la infección puede agravarse y cronificarse en individuos inmunocomprometidos y malnutridos, niños o ancianos (Xiao y Fayer, 2008; Chalmers y Davies, 2010; Couto y col., 2013).

La multiplicación del parásito en el epitelio intestinal produce atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas e infiltración de células mononucleares en la lámina propia (Chalmers y Davies, 2010). Todo ello ocasiona la disminución de la actividad enzimática y de la superficie de absorción, lo cual se traduce en diarrea por mala absorción, mala digestión e hiperósmosis (Klein y col., 2008; Zambriski y col., 2013). Asimismo, se produce aumento en la secreción de prostaglandinas como PGI<sub>2</sub>, que actúa sobre el sistema nervioso entérico y PGE<sub>2</sub>, que ejerce su acción directamente sobre el enterocito. Finalmente, se ve afectada la producción de cloro y bicarbonato e inhibida la absorción de sales en las vellosidades, todo lo cual contribuye a la pérdida de fluidos (Foster y Smith, 2009; Wyatt y col., 2010).

El epitelio intestinal generalmente se recupera tras la remisión de los síntomas, aunque algunas secuelas pueden permanecer más tiempo. Por ejemplo, la infección por *C. hominis* se ha asociado con dolor articular, dolor ocular, dolor de cabeza y fatiga durante los dos meses siguientes al inicio de los síntomas (Chalmers y Katzer, 2013).

El inicio de la excreción ooquistica depende de la dosis ingerida, siendo esta una relación inversamente proporcional (Zambriski y col., 2013). En los terneros, los casos clínicos pueden aparecer a los 7 – 30 días de edad y van desde diarrea acuosa, depresión y anorexia, dolor abdominal, hasta muerte debido a deshidratación y fallo cardiovascular (Tomazic y col., 2013).

La virulencia es comúnmente definida como la capacidad que tiene un microorganismo para causar enfermedad y es indicativa del grado de patogenicidad (Bouazid y col., 2013). Los factores de virulencia de *Cryptosporidium* se encuentran implicados en la adhesión, colonización, invasión y evasión de la respuesta inmune del hospedador, por lo que el conocimiento de estas moléculas resulta esencial para comprender los mecanismos de patogenicidad (Tzipori y Ward, 2002; Bouazid y col., 2013). En la Tabla 2. se recogen algunos de estos factores, que participan en el desenquistamiento, adhesión, locomoción e invasión.

**Tabla 2 Factores de virulencia de *Cryptosporidium* spp.**

<b>Factor</b>	<b>Función</b>	<b>Localización / Peso Molecular</b>	<b>Referencia</b>
CSL	Adhesión	Esporozoítos y merozoítos / 1300 KDa	Riggs y col., 1997; Langer y Riggs, 1999.
CP15	Adhesión	Esporozoítos y merozoítos infectantes / 15 KDa	Reperant y col., 1992; Jenkins y Fayer, 1995; Sagodira y col., 1999.
P23	Adhesión, locomoción	Esporozoítos y merozoítos infectantes / 23 KDa	Arrowood y col., 1989; erryman y col., 1996; Riggs y col., 1997; Perryman y col., 1999; Riggs, 2002.
Gp15	Adhesión	Superficie esporozoíto / 14 – 16 KDa	Mead y col., 1988; Tilley y col., 1990; Tilley y Upton, 1990; Tilley y col., 1991; Tilley y Upton, 1994; Cevallos y col., 2000; Strong y col., 2000.
Gp40	Adhesión	Región apical de los esporozoítos y merozoítos / 40 – 45 KDa	Cevallos y col., 2000.
Gp900	Adhesión	Micronemas y a superficie de los estados invasivos/ 900 KDa	Barnes y col., 1998; Petersen y col., 1992; Bonnin y col., 2001.
Proteasa Serina	Desenquistamiento	Superficie del esporozoíto / ---	Forney y col., 1996.
Aminopeptidasa	Desenquistamiento	Superficie del esporozoíto / ---	Okhuysen y col., 1996.
P30	Adhesión	Esporozoíto / 30KDa	Bhat y col., 2007.
TRAP-C1	Adhesión, locomoción	Micronema/ 76 KDa	Spano y col., 1998.

<b>Factor</b>	<b>Función</b>	<b>Localización / Peso Molecular</b>	<b>Referencia</b>
Cp47	Adhesión	Superficie del esporozoíto / 47 KDa	Nesterenko y col., 1999.
CPS-500	Adhesión, locomoción	Esporozoíto y merozoíto / ---	Bjorneby y col., 1990; Riggs y col., 1989.
Cp2	Invasión, integridad de la membrana	Esporozoíto y vacuola parasitófora / 82 KDa	O'Hara y col., 2004.
Cpa135	Invasión	Esporozoíto / 135 KDa	Tosini y col., 2004.
Fosfolipasa secretoria (sPLA <sub>2</sub> )	Invasión	Esporozoítos / ---	Pollok y col., 2003.
Hemolysin H4	Lisis de la membrana	Merozoíto / ---	Steele y col., 1995.
CpABC	Transporte de nutrientes	Esporozoíto y estados intracelulares / 200 KDa	Perkins y col., 1999.
CpATPase2	Transporte de metales pesados (Cu)	Dentro del Esporozoíto / 144,7 KDa	LaGier y col., 2001.
CpATPase3	Transporte de fosfolípidos	Dentro del esporozoíto / 169,7 KDa	LaGier y col., 2002.
Hsp70	Proteína de choque térmico	Citoplasma del esporozoíto / 70 KDa	Khramtsov y col., 1995.
Hsp90	Proteína de choque térmico	Citoplasma del esporozoíto / 90 KDa	Woods y col., 1999.
CpPKS1	Metabolismo de ácidos grasos	Esporozoíto / 1516 KDa	Zhu y col., 2002; Fritzler y Zhu, 2007.

<b>Factor</b>	<b>Función</b>	<b>Localización / Peso Molecular</b>	<b>Referencia</b>
Cisteína proteasa	Modulación inmune/citoquinas	Superficie del esporozoíto / 24 KDa	Nesterenko y col., 1995.
Acetil cosintetasa	Metabolismo de ácidos grasos	Esporozoíto / 86,1 KDa	Camero y col., 2003.
CpSUB	Invasión	Región apical de esporozoíto y merozoíto / 48 KDa	Wanyiri y col., 2009.
CpMIC1 (CpTSP8)	Adhesión, locomoción	Complejo apical del esporozoíto y merozoíto / 66 – 76 KDa	Putignani y col., 2008.
CpMuc	Invasión	Esporozoíto / 75 – 98 KDa	O'Connor y col., 2009.
GP25-200	Invasión	Región apical esporozoíto / 25-200 KDa	Arrowood y col., 1989; Riggs y col., 1997.

**Modificada de:** Boulter-Bitzer y col. (2007); Bouzid y col. (2013); Okhuysen y Chappell (2002).

## 4 RESPUESTA INMUNE

En el ciclo biológico de *Cryptosporidium* hay dos estadios móviles encargados de la invasión de las células hospedadoras, los esporozoítos y merozoítos. Ambos se consideran los más susceptibles a la acción de los fármacos y al efecto del sistema inmune del hospedador, ya que a diferencia de otros parásitos intracelulares están temporalmente expuestos en la luz intestinal (Trasarti y col., 2007) (Figura 4).

### 4.1 INMUNIDAD INNATA

Las células epiteliales constituyen la primera línea de defensa de la mucosa intestinal, al producir citoquinas que estimulan la degranulación de las células de Paneth y atraen neutrófilos y linfocitos (Wilhelm y Yarovsky, 2014). Los radicales libres como el óxido nítrico (ON), producido por macrófagos y neutrófilos, también desempeñan un papel de protección contra los microorganismos invasores. La síntesis de ON se incrementa significativamente durante la infección por *Cryptosporidium*, tal como demuestra la expresión de óxido nítrico sintetasa (iNOS) por el epitelio infectado. De hecho, la ausencia o inhibición de esta enzima incrementa significativamente la infección epitelial (Petry y col., 2010).

Algunas citoquinas producidas por las células epiteliales, tales como la interleucina-18 (IL-18), inducen la producción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual juega un papel importante en la inmunidad frente a *Cryptosporidium* (Ehigiator y col., 2007; Petry y col., 2010). De hecho, el IFN- $\gamma$  resulta trascendental en el control de la infección por protozoos intracelulares, ya que tiene la capacidad de inhibir el desarrollo intracelular del parásito (Pantenburg y col., 2008; Wilhelm y Yarovsky, 2014)

Las células epiteliales son también fuente de IL-17A, que activa las células Th foliculares y estimula la producción de anticuerpos (Drinkall y col., 2017). Entre las sustancias producidas por las células epiteliales también se encuentran CCL5 y CXCL10. La primera molécula actúa como una sustancia quimiotáctica para las células Th1 y monocitos, mientras que CXCL10 atrae macrófagos y células NK, T y B (Menzies y col., 2016). Según Olsen y col. (2015), las células NK jugarían un papel

importante en la respuesta inmune temprana frente a *Cryptosporidium*, ya que producen IFN- $\gamma$  e inducen la apoptosis en las células infectadas, eliminando el parásito del intestino (Olsen y col., 2015).

Las células dendríticas también desempeñan un papel fundamental en la inmunidad intestinal mediada por células, ya que son capaces de asimilar, procesar y presentar antígenos a las células T, conectando la inmunidad innata y adquirida (Reis Sousa, 2001). Estas células están distribuidas en diferentes tejidos y órganos y representan la principal fuente de interleucinas como IL-12, IL-6, así como TNF- $\alpha$  (Thomson y col., 2017). Finalmente, cabe destacar el papel de los linfocitos  $\gamma\delta$ , que constituyen una subpoblación de los linfocitos T caracterizados por presentar un receptor TCR. Estos linfocitos T abundan en tejidos epiteliales, especialmente en la mucosa intestinal y llegan al sitio de infección atraídos por las proteínas de choque térmico que segrega *Cryptosporidium*, estando involucrados en el control temprano de la infección por este protozoo (Deng y col., 2004; Thomson y col., 2017).

#### **4.2 INMUNIDAD ADQUIRIDA**

La respuesta inmune generada por *C. parvum* suele ser principalmente de tipo Th1, caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$  e IL-12, que actúan de forma sinérgica para activar macrófagos y producir altos niveles de óxido nítrico e IL-12 (Codices y col., 2013). Los linfocitos Th1 también tienen capacidad de producir IL-2 y TNF- $\beta$ , citoquinas que mejoran la respuesta citotóxica (Chappell y col., 2003). La respuesta Th1 es necesaria para el control del parásito, aunque puede llegar a ser contraproducente si ocasiona ileítis aguda, como se ha descrito en algunos pacientes inmunocompetentes (Wilhelm y Yarovinsky, 2014). La intensa respuesta por parte de las células Th1 va seguida de una respuesta más equilibrada por células Th2, que facilita la eliminación del parásito y limita la patología (Codices y col., 2013).

Los linfocitos Th2 producen diferentes tipos de interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$ ), cuya principal función parece ser regular la fuerte respuesta generada por las citoquinas secretadas por los linfocitos Th1 (Wilhelm y Yarovinsky, 2014). Los valores de IL-4 e IL-5 se incrementan a los 21 días post infección, lo cual se relaciona con la producción de IgE e IgA, respectivamente. La IL-4 tiene capacidad de inhibir los mecanismos efectores de Th1, bloqueando por lo tanto la producción de

citoquinas por Th1 (Codices y col., 2013). Según Noltley y col. (2013), esta interleucina jugaría un papel importante en el control de la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium*, puesto que cuando actúa junto con TGF- $\beta$  se regula el cambio de IgM a IgA, inmunoglobulina esencial para evitar que el parásito logre adherirse a los enterocitos (Chappell y col., 2003; Wilhelm y Yarovsky, 2014).

Otro papel importante en la respuesta inmune a nivel intestinal viene desempeñado por la presencia de TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23, que inducen la diferenciación de las células Th hasta células Th17 en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Estas células estimulan la inflamación y causan la apoptosis de las células intestinales mediante la producción de IL-17 y TNF- $\alpha$  (Zhao y col., 2016; Thomson y col., 2017). Finalmente, cabe destacar la funciones de las denominadas citoquinas inflamatorias como IL-10 y el TGF- $\beta$ , que se encargarían de contrarrestar los efectos nocivos ocasionados por esa intensa respuesta inflamatoria a nivel intestinal (Pantenburg y col., 2008).

En relación con los anticuerpos producidos durante una infección primaria por *C. parvum*, se sabe que la respuesta está caracterizada por un ligero incremento de IgM seguido por una respuesta de tipo IgG, específicamente IgG1. Por el contrario, la respuesta secundaria se caracteriza por una producción relativamente baja de IgM y mayores cantidades de IgG (IgG2a), lo que conduce a la neutralización del patógeno y aumento en la producción de IFN- $\gamma$  (Codices y col., 2013).

El papel protector de los anticuerpos neutralizantes se basa en su capacidad para inhibir la invasión celular por parte de los esporozoítos y merozoítos, únicos estadios que se encuentran libres en el lumen intestinal (Petersen y col., 1992). Los anticuerpos pueden actuar bloqueando la interacción del parásito con la célula hospedadora, lo cual puede facilitarse en gran medida por determinados mecanismos efectores (ej. Activación del complemento / lisis) (de Graaf y col., 1999).

Las inmunoglobulinas de la subclase IgG1, asociadas a la neutralización de patógenos, aparecen en los 5 días posteriores a la infección, mientras que los anticuerpos IgG2, asociados a citotoxicidad, aparecen algo más tardíamente, sobre el día 7 p.i., periodos asociados a la enfermedad clínica y la recuperación, respectivamente (Wyatt y col., 2010). El máximo nivel de anticuerpos específicos se

alcanza entre las semanas 3 y 9 pi, manteniéndose un nivel elevado durante 5 a 6 meses (Lazarus y col., 2015).

Por lo que respecta a los antígenos que estimulan la respuesta inmune humoral destacan dos con peso molecular de 15/17 kDa y 27 KDa. El primero estimula una fuerte respuesta en los 6 meses pi., produciendo anticuerpos detectables en suero durante 10 meses e indicando una infección reciente. La respuesta que estimula el antígeno de 27 kDa es más débil pero más estable, ya que los anticuerpos generados se mantienen durante periodos superiores a 1 año y reducen el riesgo de diarrea en los pacientes que han padecido la infección (Wanyiri y col., 2014; Farkas y col., 2015).





## 5 CUADRO CLINICO

### 5.1 GANADO VACUNO

La primera descripción de la infección por *Cryptosporidium* en ganado vacuno se realizó en 1971 en una novilla de 8 meses afectada de diarrea crónica. Los hallazgos histopatológicos evidenciaron la atrofia de las vellosidades y presencia de estadios de desarrollo de *Cryptosporidium* en el borde de las microvellosidades del epitelio (Panciera y col., 1971). En los años siguientes, la infección fue descrita en ganado vacuno en numerosos países y actualmente se considera uno de los principales enteropatógenos implicados en la etiología del síndrome de diarrea neonatal, ocasionando importantes pérdidas económicas en las explotaciones no sólo por la elevada morbilidad y mortalidad, sino por el retraso del crecimiento que padecen los animales que se recuperan de la enfermedad (de Graaf y col., 1999).

Los estudios moleculares han revelado que son cuatro las especies más frecuentemente identificadas en ganado vacuno, con un patrón de aparición que según numerosos autores está asociado a la edad, siendo *C. parvum* la especie principalmente implicada en los brotes de diarrea, al ser más prevalente en terneros lactantes, mientras que otras dos especies predominan en terneros destetados y novillas (*C. bovis*, *C. ryanae*) y *C. andersoni* es la más frecuente en animales adultos (Santín y col., 2004; Fayer y col., 2010).

La criptosporidiosis afecta principalmente a terneros neonatos entre la primera y tercera semana de vida y se manifiesta con diarrea profusa de color amarillento y consistencia pastosa o líquida, habitualmente no sanguinolenta. El cuadro diarreico se inicia entre los 3-5 días post-infección (p.i.) y persiste durante un periodo de tiempo similar, aunque en algunas ocasiones se prolonga hasta dos semanas. Su aparición coincide con intensa excreción ooquistica, cuya duración depende de factores tales como la edad o el estado inmunológico del animal (Fayer y col., 1998; de Graaf y col., 1999). Las estimaciones señalan que un ternero que produzca diariamente 5,4 Kg de heces puede eliminar en torno a  $3 \times 10^{10}$  ooquistes, durante un periodo que puede prolongarse entre 6 y 12 días (Nydam y col., 2001; Zambriski y col., 2013). La

identificación de ooquistes en las heces de terneros de tan solo 3 días demuestra que los rumiantes pueden infectarse inmediatamente tras el nacimiento (Quílez y col., 1996; Fayer y col., 1998).

La diarrea se puede acompañar de otros síntomas, como anorexia, deshidratación, fiebre, pérdida de peso, debilidad y pérdida progresiva de la condición corporal. La mayoría de los animales se recuperan en 1 o 2 semanas, aunque la morbilidad puede alcanzar el 100% y algunos animales pueden morir deshidratados en 24-48 horas (Santín y col., 2007). En la necropsia se comprueba que el intestino delgado está congestivo, con mucosa hiperémica, aunque no hemorrágica y contenido amarillento y acuoso. En el ciego y colon hay acúmulo de gas y el abomaso contiene frecuentemente leche sin digerir formando coágulos (Sanford y Josephson, 1982; Heine y col., 1984). En ocasiones, en la cavidad abdominal hay atrofia de la grasa mesentérica e infarto de los ganglios regionales, que aumentan de tamaño y aparecen congestivos y edematosos (Tzipori y col., 1983).

En el estudio histológico de la mucosa intestinal se comprueba que los estadios endógenos de *C. parvum* se localizan preferentemente en la zona distal del intestino delgado, especialmente en la porción final del yeyuno e íleon, donde provocan atrofia de las vellosidades, que aparecen acortadas y engrosadas y ocasionalmente fusionadas. Estas alteraciones aparecen a las 48 – 72 horas pi. y son consecuencia de las fases de esquizogonia y gametogonia. Como consecuencia de la pérdida de los enterocitos de la superficie apical de las vellosidades, el epitelio es sustituido por una población celular inmadura similar a la existente en las criptas intestinales, con baja capacidad enzimática y de absorción. Junto con las lesiones intestinales se pueden observar diversos grados de deshidratación y caquexia (Tzipori, 1988).

A diferencia de las especies de localización intestinal, *C. andersoni* infecta las glándulas gástricas del abomaso en el ganado vacuno juvenil y adulto y raramente afecta a terneros neonatos (Lindsay y col., 2000; Santín y col., 2008). La infección no produce diarrea y tiene curso crónico, con un periodo de prepatencia de 18 – 45 días y periodo de patencia superior a los 90 días, pudiendo incluso prolongarse hasta 4 años (Kvác y col., 2008; Santín y Trout, 2008). *C. andersoni* puede ser una causa de gastritis, disminución en la ganancia de peso y reducción en la producción de leche (Enemark y col., 2002).

## 5.2 GANADO PORCINO

La criptosporidiosis en el ganado porcino fue descrita por primera vez en 1977 en la necropsia de 3 cerdos en los que se observaron estadios del parásito en el borde de las microvellosidades del intestino grueso. A pesar de estos hallazgos, los animales no presentaban signos clínicos de enteritis (Kennedy y col., 1977). A diferencia del ganado vacuno, en el que la infección es mucho más prevalente durante el periodo de lactación, los estudios realizados en cerdos con infecciones naturales revelan que la mayor prevalencia en esta especie animal se registra tras el destete de los cerdos, entre las 5 y 8 semanas de edad y se asocia a una excreción ooquistica muy inferior a la descrita en terneros (Hamnes y col., 2007; Johnson y col., 2008).

Otra diferencia muy relevante está relacionada con el cuadro clínico asociado a la infección, ya que *Cryptosporidium* no parece ser una causa frecuente de enteritis en las explotaciones porcinas. Sanford (1987) observó la presencia de síntomas en el 26% de los cerdos infectados y algunos estudios han asociado la infección por este protozoo con la presencia de diarrea en lechones (Hamnes y col., 2007). Sin embargo, la mayoría de autores coinciden en afirmar que las infecciones naturales por *Cryptosporidium* en cerdos cursan habitualmente de forma subclínica (Sanford, 1987; Adesiyun y Kaminjolo, 1994; Quílez y col., 1996; Wieler y col., 2001; Guselle y col., 2003; Maddox-Hyttel y col., 2006; Vítovec y col., 2006; Zintl y col., 2007).

Hasta el momento son seis las especies de *Cryptosporidium* descritas en ganado porcino, entre las que se incluyen *C. suis* y *C. scrofarum* (= genotipo porcino II) como más prevalentes y adaptadas a este hospedador, junto con *C. parvum*, *C. muris*, *C. andersoni* y *C. tyzzeri* (Johnson y col., 2008; Kvác y col., 2013; Lin y col., 2015). La infección por *C. suis* no guarda un patrón asociado a la edad, habiéndose identificado en todas las etapas de la producción porcina, mientras que *C. scrofarum* suele afectar a animales mayores de 4 semanas (Jeníková y col., 2011; Kváč, y col., 2014). Las infecciones por *C. scrofarum* suelen ser subclínicas, mientras que las debidas a *C. suis* pueden estar asociadas con diarrea, aunque los síntomas más graves se han observado en lechones infectados con *C. parvum* (Hamnes y col., 2007).

Las infecciones clínicas se han descrito fundamentalmente en lechones de más de 1 semana de vida y cursan con diarrea no hemorrágica, que afecta negativamente a la ganancia de peso e índices de conversión (Schubnell y col., 2016). Los animales afectados están menos vivaces y eliminan heces diarreicas de color parduzco durante 3-5 días. Los lechones recién destetados presentan anorexia, pelo erizado y excretan heces pastosas. Al igual que sucede en otros hospedadores, los cambios más importantes se observan en el intestino delgado, que aparece inflamado y con graves daños de la mucosa, con atrofia y fusión de las vellosidades e hiperplasia de las criptas. También se ha constatado la reducción en la absorción de NaCl en respuesta a la liberación de prostaglandinas en el tejido inflamado (Argenzio y col., 1996; Enemark y col., 2003; Guselle y col., 2003; Maddox-Hyttel y col., 2006; Zadrozny y col., 2006).

### 5.3 HUMANOS

Los dos primeros casos de criptosporidiosis humana fueron publicados a mediados de la década de 1970 en un niño de 3 años y un hombre de 39 años, respectivamente, este último afectado por una inmunosupresión inducida por medicamentos (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976). No obstante, la criptosporidiosis no adquiere trascendencia entre la comunidad médica hasta comienzos de la década siguiente, coincidiendo con el inicio de la pandemia de SIDA, debido a la gravedad del cuadro clínico, ocasionalmente mortal, con el que se manifestaba la enfermedad en este grupo de pacientes (Checkley y col., 2015).

Actualmente se considera una enfermedad emergente y desde el año 2004, la Organización Mundial de la Salud incluyó la criptosporidiosis en la “Iniciativa de Enfermedades Olvidadas”, por su elevada morbilidad, mortalidad e implicaciones socioeconómicas que la relacionan con las comunidades más pobres del planeta (Savioli y col., 2006). Hasta el momento, son diversas las especies de *Cryptosporidium* descritas en el ser humano (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis* y *C. muris*), aunque las dos primeras son con mucha diferencia las más prevalentes (Nichols, 2008). La dosis infectante media (ID<sub>50</sub>) ha sido estimada en 132 ooquistes, aunque esta cifra es variable dependiendo del aislado (Fayer y col., 2000).

Las manifestaciones clínicas dependen de la edad y del estado inmunológico del hospedador; siendo los niños menores de 5 años más susceptibles (Siwila y col., 2011). La mayoría de casos en personas inmunocompetentes son esporádicos y autolimitantes, pudiendo involucrar tanto a niños como adultos. El inicio de la enfermedad diarreica es usualmente agudo, tras un periodo de incubación de 3 a 14 días y se asocia con el aumento en la frecuencia de movimientos intestinales, vómito, fiebre y fatiga (Kenzie y col., 1994; Warren y Guerrant, 2008). En el caso de los niños, la infección puede conducir a una alteración en el estado nutricional, que se soluciona cuando remite la diarrea, aunque el efecto negativo sobre la aptitud física no se recupera (Guerrant y col., 1999). Por el contrario, el cuadro diarreico puede ser más grave e incluso fulminante en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquéllos con un bajo recuento de linfocitos CD4.

La infección comienza en el intestino delgado, donde los esporozoítos infectan a los enterocitos, pudiendo posteriormente diseminarse al intestino grueso. La pérdida de células epiteliales ocasiona marcado acortamiento y fusión de las vellosidades, así como alargamiento de las criptas, debido a la aceleración de la división celular como mecanismo compensatorio por la pérdida celular. Estas lesiones reducen la superficie de absorción intestinal y con ello la absorción de fluidos, electrolitos y nutrientes del lumen (Tzipori y Ward, 2002). Por ejemplo, la atrofia de vellosidades impide la absorción de lactosa y D – xilosa y contribuye a desencadenar la diarrea, ya que los azúcares no absorbidos se degradan en el intestino, produciendo ácidos volátiles que cambian la presión osmótica y provocan flujo de líquido hacia la luz intestinal (Clark y Sears, 1996).

Una característica de la criptosporidiosis observada en individuos inmunocomprometidos, especialmente en aquéllos con muy bajo recuento de linfocitos CD4, es la posible presentación de formas atípicas de la enfermedad, donde la infección se extiende a localizaciones extraintestinales. De hecho, se han encontrado estadios de desarrollo del parásito en esófago, estómago, apéndice, colon, recto, vesícula biliar, pulmones, hígado, páncreas e incluso conjuntiva ocular. La presencia del parásito en estas localizaciones ha sido asociada con síntomas respiratorios, hepatitis, pancreatitis, colecistitis, colangitis y conjuntivitis (Bushen y col., 2006). La infección del tracto respiratorio superior por *Cryptosporidium* puede causar inflamación de la mucosa nasal, tráquea, laringe o senos paranasales, acompañada por descarga nasal y cambios en la voz. La criptosporidiosis del tracto respiratorio inferior

generalmente ocasiona tos productiva, disnea, fiebre e hipoxemia (Sponseller y col., 2014).

## 6 DIAGNÓSTICO

La criptosporidiosis es una patología que carece de síntomas patognomónicos, lo que hace imprescindible el diagnóstico de laboratorio. Para ello se debe identificar el parásito, sus antígenos o ácido nucleico en las heces, fluidos corporales o tejidos del hospedador. Con esta finalidad se pueden utilizar métodos histológicos, coprológicos y diversas técnicas de tinción o fluorescencia. Por otra parte, en las últimas décadas se han puesto a punto numerosas técnicas de biología molecular, que además de identificar *Cryptosporidium* permiten diferenciar las especies, genotipos y subtipos (Checkley y col., 2015).

### 6.1 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Aunque la criptosporidiosis se diagnostica hoy en día preferentemente por técnicas coprológicas o moleculares, la identificación de estadios endógenos del parásito a partir de biopsias o muestras obtenidos tras la necropsia fue la alternativa utilizada en los primeros casos observados en humanos o animales (Casemore, 1991). Los estadios de desarrollo se observan en las microvellosidades como cuerpos pequeños y esféricos de aproximadamente 2 a 5  $\mu\text{m}$  tras la tinción de los cortes histológicos con hematoxilina-eosina.

El estudio histopatológico de biopsias de intestino delgado es útil para el diagnóstico en pacientes inmunocomprometidos con síntomas gastrointestinales persistentes de etiología desconocida, o animales que han muerto con signos clínicos compatibles con la criptosporidiosis. Análogamente, resulta útil para diagnosticar la criptosporidiosis respiratoria, a partir de cortes de tráquea, bronquios, bronquiolos o pulmón (Sponseller y col., 2014). No obstante, la obtención de este tipo de muestras requiere procedimientos invasivos y puede proporcionar falsos resultados negativos, ya que no todas las zonas del tejido está afectadas por igual (Chalmers y Katzer, 2013).

## **6.2 DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO**

### **6.2.1 Recogida y conservación de muestras**

Aunque los tejidos y fluidos que se pueden remitir al laboratorio para identificar la presencia de *Cryptosporidium* son muy diversos (esputo, bilis, secreciones, etc), las muestras de heces son sin duda alguna las más utilizadas para el diagnóstico. A ser posible, éstas deben recolectarse durante la fase aguda de la infección y ser procesadas a la mayor brevedad, preferente en las primeras 24 horas (Chalmers, 2012).

El número de ooquistes están influenciado por factores diversos, tales como los periodos de prepatencia y patencia y la presencia o ausencia de diarrea, por lo que pueden observarse falsos resultados negativos. De hecho y al igual que sucede con otros protozoos, los ooquistes se eliminan de forma intermitente, por lo que el análisis de una sola muestra permite diagnosticar entre el 58% y 72% de las infecciones, siendo necesario el análisis microscópico de hasta tres muestras fecales del mismo individuo para incrementar la sensibilidad (McHardy y col., 2014).

Si la muestra de heces no va a ser procesada en los días siguientes a su obtención se puede preservar en formol tamponado al 10%, polivinil alcohol, acetato sódico/ácido acético/formol, dicromato potásico al 2,5% o refrigeradas a 4°C. No obstante, la conservación con formalina puede inhibir los análisis moleculares (Smith, 2008; Chalmers y Katzer, 2013). Las heces también se pueden congelar por un periodo de hasta 2 años, sin que esto afecte la calidad del ADN para estudios moleculares (Chalmers, 2012).

### **6.2.2 Técnicas de concentración**

Este tipo de técnicas permiten concentrar los ooquistes presentes en un determinado volumen de muestra y separarlos de los restos fecales, por lo que resultan más fácilmente identificables tanto en fresco como mediante las técnicas de tinción o fluorescencia que se pueden aplicar posteriormente. El proceso de concentración incrementa por tanto la sensibilidad del diagnóstico, siendo especialmente recomendable en muestras de individuos asintomáticos donde la



eliminación es poco intensa, aunque con todas las técnicas se produce la pérdida de un determinado porcentaje de los ooquistes presentes originalmente (Pacheco y col., 2013).

Su fundamento se basa en métodos de flotación o sedimentación difásica, que también resultan adecuados para concentrar ooquistes en otro tipo de fluidos (Chalmers, 2012). Las técnicas de flotación utilizan soluciones saturadas de sales (cloruro sódico, sulfato magnésico, sulfato de cinc) o azúcares (sacarosa de Sheater) con una densidad elevada (1,2 - 1,4) y proporcionan ooquistes limpios, aunque deben ser observados en fresco y pueden confundirse con levaduras que aparecen en ocasiones en las heces. Por otra parte, en todos los casos se aconseja una rápida observación, pues al ser soluciones hipertónicas terminan deformando los ooquistes. Las técnicas de sedimentación difásica se pueden realizar con formol-éter y formol-acetato de etilo y permiten tanto la observación directa de los ooquistes como la realización de tinciones diferenciales (Chalmers y Katzer, 2013).

### **6.2.3 Técnicas de tinción**

Las tinciones que se han utilizado para *Cryptosporidium* son numerosas, desde las más simples (Giemsa), hasta tinciones negativas o diferenciales, que utilizan la propiedad ácido-resistente de la pared de los ooquistes para colorearlos de forma selectiva y diferenciarlos de levaduras u otras estructuras presentes en las heces. Su sensibilidad es variable (Tabla 3), aunque ninguna permite identificar las especies de *Cryptosporidium*, cuyo diagnóstico requiere de técnicas moleculares (Jex y col., 2008).

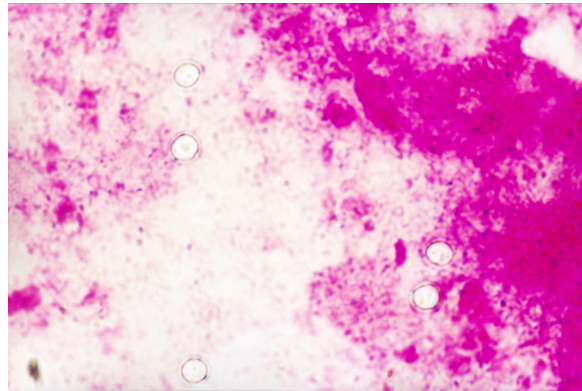
Las tinciones negativas se realizan sobre frotis de heces sin concentrar y utilizan productos que colorean el fondo de la preparación, como la fucsina fenicada (Heine, 1982), sobre el cual destacan los ooquistes que aparecen como cuerpos refringentes no coloreados (Figura 5). Las tinciones diferenciales se pueden aplicar sobre frotis fecales directos o a partir del sedimento obtenido tras la concentración de la muestra y entre ellas destaca la tinción de Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen y Pohlenz, 1981), que combina fucsina fenicada con verde de malaquita y colorea los ooquistes de rojo frente al tono verde-azulado del resto de la preparación (Figura 6). Otras tinciones diferenciales combinan safranina con azul de metileno o verde de malaquita (Fayer y col., 2000; Jex y col., 2008; Potters y Esbroeck., 2010). Finalmente, cabe

destacar las tinciones con fluorocromos como la auramina, rodamina o naranja de acridina, si bien requieren microscopio de fluorescencia para examinar los frotis fecales (Ma y Soave, 1983).

**Tabla 3 Sensibilidad y especificidad de algunas tinciones usadas para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* con respecto a diferentes técnicas de referencia**

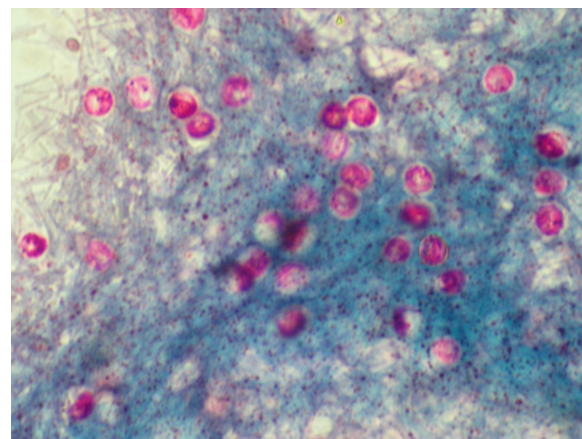
Tinción	Sensibilidad	Especificidad	Prueba de referencia	Referencia
Ziehl Neelsen modificado	67,5%, 79,3% Terneros 67,7% Porcinos 96%	--- 100% 99%	ELISA IFA IFA	Gabr y col., 2014. Quílez y col., 1996. Kehl y col., 1995.
	46,2% VIH + 32,3% VIH - 66,67%	88,9% VIH + 96,6% VIH - 88,24%	PCR IFA IFA	Omoruyi y col., 2014. Elsafi y col., 2014 Chalmers y col., 2011.
	75,7%	100%		
	76% Vacuno 54% Ovinos 66% Equinos	78% Vacuno 84% Ovinos 18% Equinos	PCR	Ezzaty y col., 2015.
Giemsa	53,75%,	----	ELISA	Gabr y col., 2014.
Auramina fenol	92,1%	100%	IFA	Chalmers y col., 2011.
Heine	76,7%	90,7%	IFA	Chartier y col., 2013.

**Figura 5 Tinción de Heine. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. procedentes de las heces un ternero**



Fuente propia

**Figura 6 Tinción de Ziehl Neelsen. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. procedentes de las heces de un ternero**



Fuente propia

Entre los inconvenientes del diagnóstico coprológico por microscopía cabe citar la cualificación del personal encargado de la identificación y el tiempo que requiere el análisis, aunque continua siendo la prueba de referencia en muchos laboratorios de todo el mundo (Helmy y col., 2013). Por ejemplo, estas técnicas se utilizan de forma rutinaria en el 80% de los laboratorios de diagnóstico humano de Inglaterra y Gales (Chalmers y col., 2015).

Por otra parte, la evaluación microscópica no puede ser considerada como una determinación cuantitativa, ya que el número de ooquistes varía considerablemente en diferentes momentos de la infección. No obstante, diversos estudios utilizan un

sistema de cruces para hacer un valoración semicuantitativa en base al número de ooquistes por campo óptico ( $\times 400$ ) de la siguiente forma:  $< 5$  ooquistes/campo (+), 1-10 ooquistes/campo (++) y  $>10$  ooquistes/campo (+++) (Chalmers, 2012).

#### 6.2.4 Técnicas inmunológicas

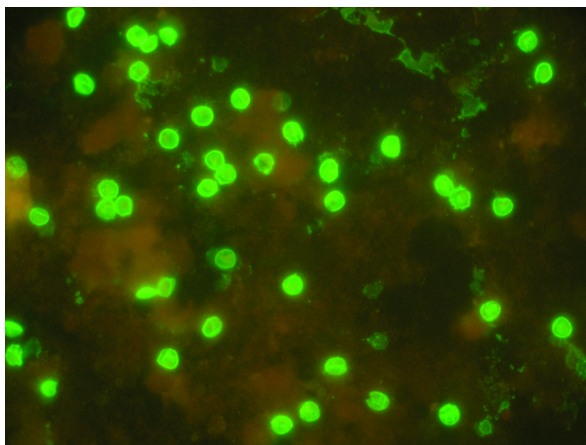
Los métodos inmunológicos utilizados para la detección de *Cryptosporidium* son diversos y ofrecen sensibilidad y especificidad variables (Tabla 4). En general, incorporan anticuerpos monoclonales específicos frente a antígenos de *Cryptosporidium* que constituyen la base de diversas pruebas comerciales de inmunofluorescencia, ELISA e inmunocromatografía. No obstante, ninguna de ellas permite identificar las especies o subtipos, al igual que sucede con las tinciones anteriormente mencionadas (Chalmers, 2012; Checkley y col., 2015).

**Tabla 4 Sensibilidad y especificidad de algunas pruebas inmunológicas para la identificación de antígenos de *Cryptosporidium* con respecto a diferentes técnicas de referencia**

Prueba	Sensibilidad	Especificidad	Prueba de referencia	Referencia
ELISA	22% Ganado vacuno 85% Ovinos 0% Equinos	82% Ganado vacuno 24% Ovinos 0% Equinos	PCR	Ezzaty y col., 2015.
	80,1%	100%	Microscopía	Elgun y Koltas, 2011.
ELISA sandwich	92,3% VIH+ 96,9% VIH-	36,9% VIH+ 30,1% VIH -	PCR	Omoruyi y col., 2014.
IFA	58% Ganado vacuno 90% Ovinos 100% Equinos	93% Ganado vacuno 80% Ovinos 31% Equinos	PCR	Ezzaty y col., 2015.
	61,8%	100%	IFA	Chartier y col., 2013.
Inmunocromatografía	84,9%	100%	IFA	Chalmers y col., 2011.

Entre estas técnicas destacan las pruebas de inmunofluorescencia, que de acuerdo con diversos estudios comparativos proporcionan una sensibilidad y especificidad significativamente mayor que las tinciones convencionales (Figura 7). Estas técnicas son usadas tanto en laboratorios clínicos como de investigación para el estudio de muestras ambientales, a veces en combinación con técnicas de citometría de flujo, así como para la detección de estadios endógenos del parásito en tejidos. Las pruebas de inmunocromatografía también son ampliamente utilizadas en muchos laboratorios de diagnóstico clínico, destacando por la sencillez de su ejecución y ofreciendo una adecuada sensibilidad y especificidad para realizar un diagnóstico rápido (Chalmers y Katzer, 2013; Helmy y col., 2013).

**Figura 7 Inmunofluorescencia directa. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. procedentes de las heces de un ternero**



Fuente propia

### 6.3 SERODIAGNÓSTICO

El análisis del suero sanguíneo en busca de anticuerpos específicos frente a *Cryptosporidium* mediante diversas técnicas (ELISA, inmunofluorescencia indirecta, inmunoblotting) proporciona una evidencia indirecta de la exposición al microorganismo y constituye una herramienta valiosa en estudios epidemiológicos (Kjos y col., 2005). Entre sus ventajas, cabe mencionar su utilidad para identificar animales que han estado en contacto con el parásito, debido a la persistencia de

títulos significativos durante periodos prolongados, así como portadores asintomáticos que eliminan ooquistes de forma intermitente. Entre sus inconvenientes, cabe señalar que los anticuerpos habitualmente aparecen una vez finalizada la excreción ooquistica, por lo que no permiten diagnosticar infecciones recientes salvo si se produce seroconversión o incremento del título (Smith, 2008).

Otra de las limitaciones de las pruebas serológicas hace referencia a su baja especificidad, como consecuencia de la presencia de reacciones cruzadas entre *Cryptosporidium* y otros protozoos. Con las técnicas anteriormente mencionadas no se han detectado reacciones cruzadas con anticuerpos generados frente a otras coccidios como *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp., *Isospora* spp., aunque sí se han observado con *Eimeria* spp. (Lorenzo y col., 1993). La transferencia de inmunidad pasiva también representa un impedimento para el serodiagnóstico de la criptosporidiosis en animales muy jóvenes, al dificultar la detección de anticuerpos generados por el propio animal. Los estudios serológicos revelan que la prevalencia de anticuerpos en terneros lactantes es elevada, si bien su origen es probablemente calostrado (Peeters y col., 1992; Ortega y col., 1993).

#### **6.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Como se ha comentado en apartados precedentes, las técnicas de biología molecular se han convertido en herramientas imprescindibles para realizar una correcta identificación de las especies de *Cryptosporidium*, ya que los ooquistes de la mayoría de ellas son morfológicamente indistinguibles mediante microscopía. Por esta circunstancia, estas técnicas han contribuido de forma decisiva al conocimiento de la taxonomía y la epidemiología, así como el abanico de hospedadores y potencial zoonótico de las diferentes especies y genotipos (Thompson y col., 2008; Fayer, 2010).

Entre las técnicas moleculares más frecuentemente utilizadas destacan las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que utilizan cebadores específicos para amplificar de forma selectiva fragmentos de diferentes genes, por lo que ofrecen una elevada especificidad y sensibilidad. El producto obtenido puede ser analizado mediante secuenciación directa o investigar el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Jex y Gasser, 2010). La técnica de PCR se

considera más sensible que las tinciones convencionales o los métodos inmunológicos, aunque los estudios comparativos han obtenido valores de sensibilidad muy variables, comprendidos entre 1 y 10<sup>6</sup> ooquistes. Una variante de uso cada vez más extendido es la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR), que ofrece un diagnóstico más rápido que la técnica de PCR convencional y permite cuantificar el DNA y por tanto la cantidad de ooquistes presente en la muestra (Chalmers, 2012).

#### **6.4.1 Identificación de especies de *Cryptosporidium***

Para la identificación de especies se utilizan regiones del genoma con baja o moderada variabilidad. Entre las primeras destacan los genes que codifican la pequeña subunidad ribosomal del rRNA (SSU rRNA), una proteína de la pared del ooquiste (COWP), una proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP70), o el gen que codifica la actina. Entre las regiones de variabilidad moderada se han utilizado los genes que codifican para la  $\beta$ -tubulina, proteínas adhesivas relacionadas con las trombospondinas (TRAPs) o las regiones intergénicas ITS-1 e ITS-2. No obstante, el gen SSU rRNA es uno de los marcadores más frecuentemente utilizados, ya que presenta regiones semiconservadas y otras hipervariables que facilitan el diseño de primers específicos de género, además de existir un total de cinco copias distribuidas por el genoma (Xiao, 2010).

Un desafío importante en el diagnóstico molecular está representado por la identificación de infecciones mixtas por diversas especies de *Cryptosporidium*, circunstancia que se supone frecuente en muchos hospedadores y no es detectable mediante las técnicas de PCR convencional, que únicamente amplifica la más abundante. Para solventar este problema se han optimizado protocolos basados en la amplificación de marcadores específicos de especie como el locus Lib13, utilizado junto con el gen ssu rRNA por Hadfield y col. (2011) para identificar infecciones mixtas por las especies más comunes en el ser humano. Otros autores han utilizado protocolos de PCR multiplexada basada en la amplificación simultánea de diferentes fragmentos del gen de la actina, que permite diferenciar las cuatro especies más comunes de *Cryptosporidium* en ganado vacuno (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni*) sin necesidad de secuenciar el producto de PCR (Santín y Zarlenga, 2009).

#### 6.4.2 Identificación de subtipos de *Cryptosporidium*

El conocimiento del genoma de algunas especies de *Cryptosporidium* (hasta el momento se ha secuenciado la totalidad del genoma de *C. hominis*, *C. parvum* y *C. muris*), ha hecho posible la identificación de secuencias con elevado grado de polimorfismo y ha supuesto un avance decisivo en el estudio de la diversidad intraespecífica de este protozoo (Abrahamsen y col., 2004; Xu y col., 2004). La investigación de estos polimorfismos ha revelado que algunas especies presentan variantes genéticas, denominadas subtipos, con diferente especificidad de hospedador, por lo que su identificación resulta decisiva para comprender la estructura de poblaciones del parásito o identificar la posible fuente de contagio en brotes de criptosporidiosis (Hunter y col., 2007).

Uno de los marcadores más ampliamente utilizado se basa en la secuenciación del gen que codifica una glucoproteína de 60 KDa (GP60), también denominada gp15/45. Esta proteína está presente en la superficie de los esporozoítos y desempeña un papel fundamental en la adhesión y posterior invasión de los enterocitos por parte del parásito (Strong y col., 2000; Wu y col., 2003). El polimorfismo de este gen ha revelado que algunos subtipos de *C. parvum* son exclusivos del hombre y otros se comparten con los rumiantes, hallazgo que confirma los dos ciclos de transmisión (zoonótico *versus* antroponótico) mediante los cuales esta especie se mantiene y transmite en la naturaleza (Caccio y col., 2005).

La variabilidad del gen GP60 obedece a una región microsatélite situada en el extremo 5', constituida por repeticiones de trinucleótidos que codifican serina (TCA, TCG o TCT), junto con otros polimorfismos presentes en regiones no repetitivas (Xiao, 2010; Sharma y col., 2013). Con base en estos últimos se pueden diferenciar familias y subfamilias en diferentes especies y genotipos de *Cryptosporidium*, que son clasificadas con números romanos: *C. hominis* (familia I), *C. parvum* (II), *C. meleagridis* (III), *C. fayeri* (IV), *C. cuniculus* (V), genotipo de caballo (VI), *C. wrairi* (VII), genotipo de hurón (VIII), *C. tyzzeri* (IX), genotipo de visón (X), genotipo de zarigüeya (XI), *C. ubiquitum* (XII) y *C. erinacei* (XIII) (Ryan y col., 2014).

En el caso *C. parvum* se han identificado hasta el momento un total de 14 subfamilias de subtipos (IIa→IIo). La mayoría son exclusivas de aislados de origen humano y se consideran eminentemente antroponóticas, siendo especialmente



frecuente la denominada IIc. Por el contrario, dos subfamilias son compartidas por aislados de origen humano y animal y son por tanto indicativas de su carácter zoonótico, concretamente IId y especialmente la familia más prevalente en terneros en todo el mundo (IIa). En *C. hominis* se han identificado un total de nueve subfamilias (Ia→Ib, Id→Ij) (Ryan y col., 2014).

Dentro de cada subfamilia se pueden diferenciar a su vez múltiples subtipos con base al número de repeticiones de trinucleótidos en la región microsatélite. La nomenclatura utilizada para denominarlos fue propuesta por Sulaiman y col. (2005). Concretamente, el nombre de la subfamilia va seguido del número de repeticiones de los trinucleótidos TCA(A), TCG(G) y TCT(T), de forma que el subtipo IIaA15G2R1, considerado como el más prevalente de *C. parvum* en terneros y humanos, identifica una variante perteneciente a la familia de subtipos IIa cuya secuencia tiene 15 repeticiones de TCA y 2 repeticiones de TCG en la región microsatélite.

Algunos subtipos la familia IIa tienen una o más copias de la secuencia “ACATCA” inmediatamente después de la región microsatélite, lo cual permite completar la denominación con la letra “R” seguida del número de copias, tal como se puede observar en el subtipo mencionado en el párrafo anterior. Finalmente, en caso de identificar secuencias pertenecientes al mismo subtipo pero con polimorfismos fuera de la región repetitiva, se denominan con una letra minúscula al final (IIaA17G1a, IIaA17G1b, etc) (Sulaiman y col. 2005).

Otro grupo de marcadores muy polimórficos ampliamente utilizados en la investigación de la variabilidad intraespecífica de *Cryptosporidium* está representado por los microsatélites (MS) y minisatélites (MN), constituidos por repeticiones en tándem de una determinada secuencia de longitud variable (1-6 pb y 10-100 pb, respectivamente). Estos marcadores tienen polimorfismo de longitud resultante de la ganancia o pérdida de copias de la secuencia que se repite, generalmente ocurridas durante la replicación del ADN y menos frecuentemente durante la recombinación meiótica. Por el momento no existe una nomenclatura uniforme para denominar los alelos identificados con estos marcadores, por lo que los resultados obtenidos son menos comparables que los ofrecidos por la secuenciación de la gp60 (Cacciò y col., 2000; Feng y col., 2000; Cacciò y col., 2001; Mallon y col., 2003; Leoni y col., 2007).

El número de MS y MN utilizado hasta el momento para estudiar la diversidad genética de *C. parvum* y *C. hominis* supera los 55 (Robinson y Chalmers, 2012). La mayoría de estudios utilizan una combinación de varios de estos marcadores (estudios multilocus), lo cual permite determinar el subtipo multilocus de cada aislado con base a la combinación de alelos de los diferentes loci. Esta alternativa incrementa el poder discriminatorio de cada uno de ellos por separado y resulta idónea para estudiar la estructura de poblaciones y la dinámica de transmisión de *Cryptosporidium* en una zona geográfica. Entre los más utilizados cabe mencionar 5B12, CP47, GP60, hsp70, ML1, ML2, MS5-Mallon, MS9-Mallon, MSB, MSC 6-7 y TP14 (Chalmers y Katzer, 2013).

Cabe destacar que la resolución de cada marcador puede ser distinta según la especie de *Cryptosporidium*, de forma que algunos (ej. MS9) son muy polimórficos en *C. parvum*, pero poco en *C. hominis*, mientras que con otros (ej.: MSE) ocurre lo contrario. Las técnicas utilizadas para su estudio también son diversas, en ocasiones se investiga únicamente el polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados, bien mediante geles de poliacrilamida, geles Spreadex® o por electroforesis capilar con cebadores marcados. Otros autores realizan directamente la secuenciación del producto de PCR, que permite identificar tanto diferencias de longitud como sustituciones de nucleótidos (Robinson y Chalmers, 2012). La electroforesis capilar representa un considerable ahorro de tiempo y recursos frente a la secuenciación, ya que se pueden analizar varios marcadores en una misma reacción y permite detectar infecciones mixtas (Díaz y col., 2012; Quílez y col., 2014).

## **7 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS**

### **7.1 VÍAS DE TRANSMISIÓN Y FACTORES DE RIESGO**

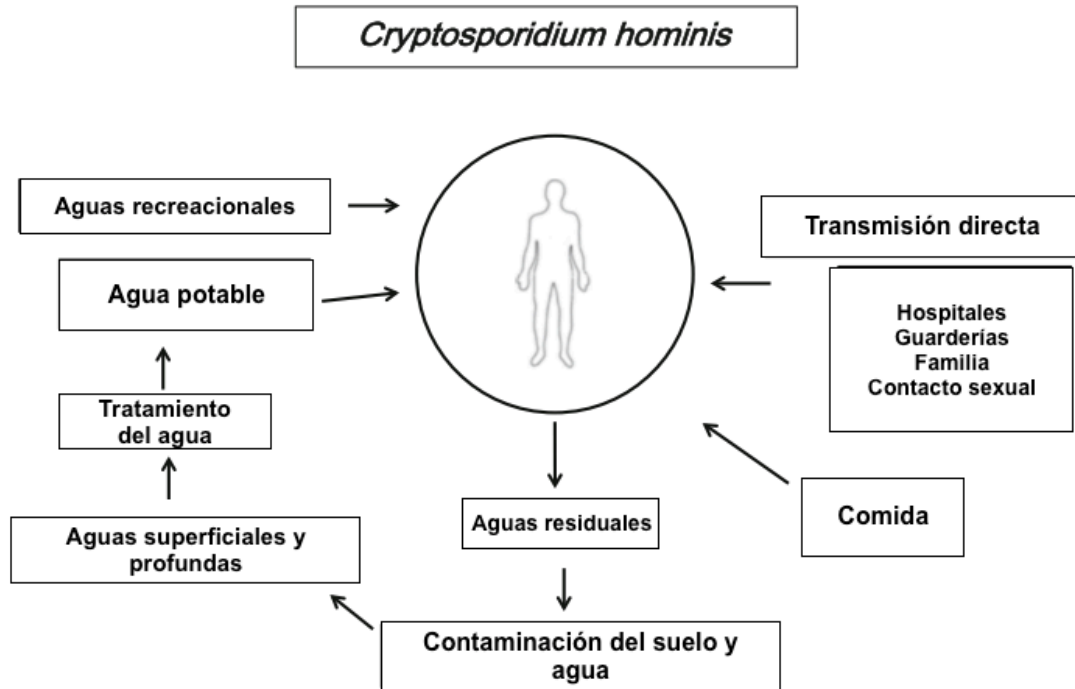
La criptosporidiosis se transmite por vía fecal – oral, mediante la ingestión de ooquistes a través de diferentes vías, ya sea por contacto directo con personas o animales infectados o de forma indirecta a través de los alimentos o el agua, incluyendo la ingestión accidental de agua utilizada con fines recreativos (Fayer y col., 2000). Algunas especies como *C. hominis* tienen un ciclo de transmisión eminentemente antroponótico, mientras que, en otras como *C. parvum*, los animales

constituyen un reservorio y pueden ser fuente de contagio para el ser humano. La transmisión aerógena se considera responsable de los casos de criptosporidiosis respiratoria, aunque epidemiológicamente parece tener escaso interés (Xiao y Ryan, 2008; Carmena, 2010) (Figuras 8 y 9).

Entre los factores que facilitan la transmisión de *Cryptosporidium* y justifican su elevada prevalencia cabe destacar el amplio abanico de hospedadores, así como la baja dosis infectante y el elevado número de ooquistes eliminado durante la fase aguda de la enfermedad. Diversos estudios han demostrado que las personas con una infección grave pueden eliminar diariamente hasta  $10^9$ - $10^{10}$  ooquistes, pudiendo infectarse con dosis ( $ID_{50}$ ) de tan sólo 10-83 ooquistes (Goodgame y col., 1993; Chappell y col., 2006).

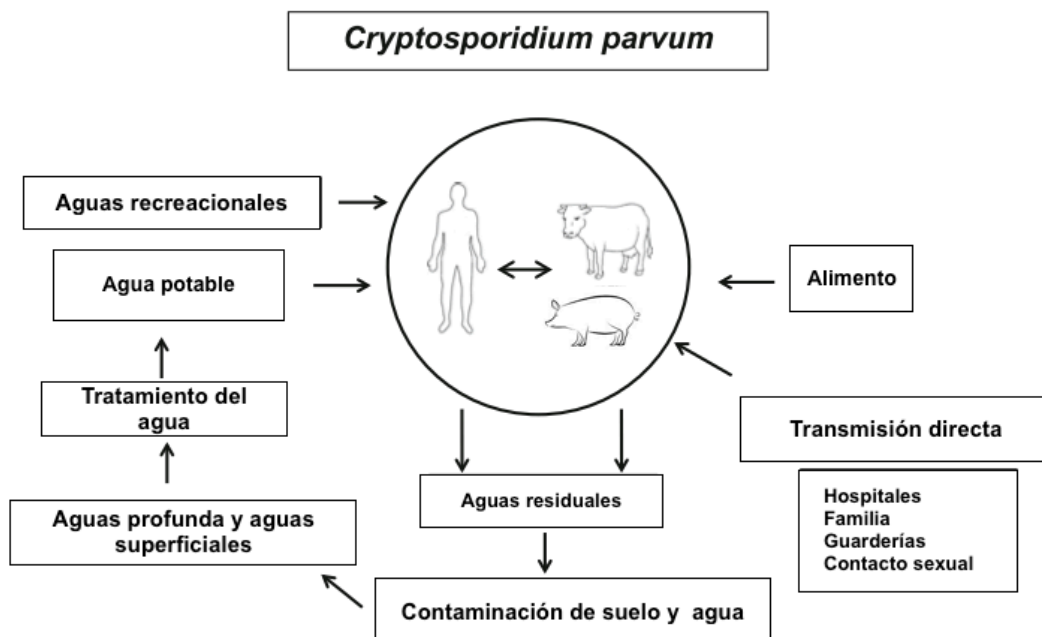
Por otra parte, cabe destacar la gran resistencia de los ooquistes en el ambiente, que les permite sobrevivir durante periodos prolongados y mantener su viabilidad en presencia de numerosos desinfectantes, incluyendo los compuestos clorados utilizados habitualmente en la potabilización del agua de bebida. Su pequeño tamaño también les permite atravesar los sistemas de filtración utilizados en muchos sistemas de potabilización, por todo lo cual la transmisión hídrica se considera la principal vía de contagio de esta enfermedad en humanos en todo el mundo (Dixon, 2009). De hecho, *Cryptosporidium* es uno de los protozoos más frecuentemente implicados en brotes de origen hídrico registrados en Europa, Norteamérica o Australia, por lo que la OMS lo considera un patógeno de referencia indicativo de la calidad del agua (Organización Mundial de la Salud, 2011).

Figura 8 Principales vías de transmisión de *C. hominis*



Modificada de: Cacciò y Widmer (2014)

Figura 9 Principales vías de transmisión de *C. parvum*



Modificada de: Cacciò y Widmer (2014).

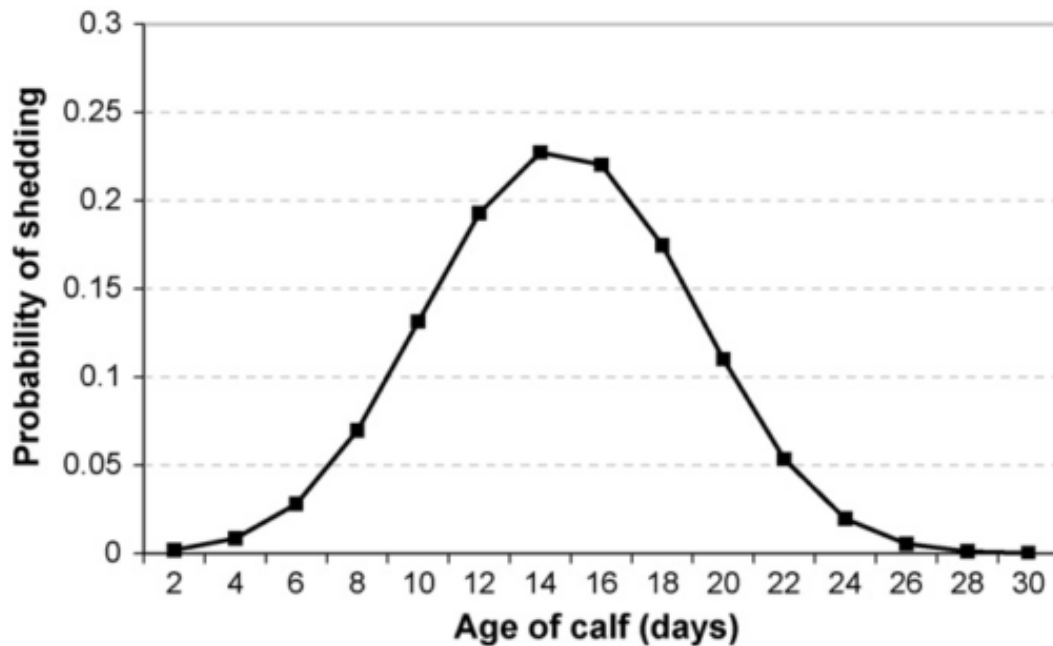
### 7.1.1 Ganado vacuno

La criptosporidiosis es una patología muy común en las explotaciones de ganado vacuno, donde se ha convertido en motivo de preocupación no sólo por las pérdidas económicas directas asociadas con la infección, sino también desde una perspectiva de salud pública, debido a la posibilidad de transmisión zoonótica de algunas especies como *C. parvum* (Santín y col., 2008). Este parásito es considerado uno de los enteropatógenos más comunes en los terneros durante las primeras semanas de vida, con un índice de morbilidad que puede alcanzar el 100% en muchas explotaciones (Thompson y col., 2008).

La principal fuente de contagio en las granjas está representada por los propios terneros neonatos infectados, que contaminan con sus heces las zonas de paridera, donde la enfermedad se transmite con rapidez por vía oral a otros terneros a partir del ambiente o cuando se amamantan, si la superficie de la ubre de las madres se ha contaminado. Las estimaciones revelan que cada ternero puede eliminar entre  $10^6$  y  $10^7$  ooquistes por gramo de heces durante la fase clínica de la enfermedad (de Graaf y col., 1999). Por esta circunstancia, la prevalencia de la criptosporidiosis suele ser superior en explotaciones con un elevado número de animales, así como granjas donde los animales jóvenes están hacinados o las condiciones higiénicas son deficientes (Fayer y col., 2000; Causapé y col., 2002; Vergara-Castiblanco y Quilez, 2004; Pasquali y col., 2006).

Según Maddox-Hyttel y col. (2006), uno de los factores de riesgo con mayor relevancia es la edad, siendo la prevalencia muy superior durante el primer mes, con un máximo en la segunda semana de vida, por todo lo cual la incidencia se incrementa significativamente en la época de partos (Figura 10). El tipo de explotación también parece influir, habiéndose demostrado mayor prevalencia en explotaciones lecheras en comparación con las de carne. Este hallazgo podría obedecer a la existencia de partos durante todo el año en las primeras, que permite la presencia de animales susceptibles y la transmisión ininterrumpida del parásito (Kvác y col., 2006).

**Figura 10** Dinámica de la eliminación de *C. parvum*



Tomada de: Trotz-Williams y col. (2007).

El riesgo de infección por consumo de agua está relacionado con la resistencia ambiental del parásito. La contaminación de los suministros de agua potable con heces puede dar lugar a brotes de criptosporidiosis si el número de ooquistes es lo suficientemente elevado para evadir los métodos de filtración o desinfección. El contagio también se puede dar en animales alimentados con leche o reemplazante lácteo preparados con agua contaminada u ofrecidos en recipientes sucios (Johnson y col., 1995).

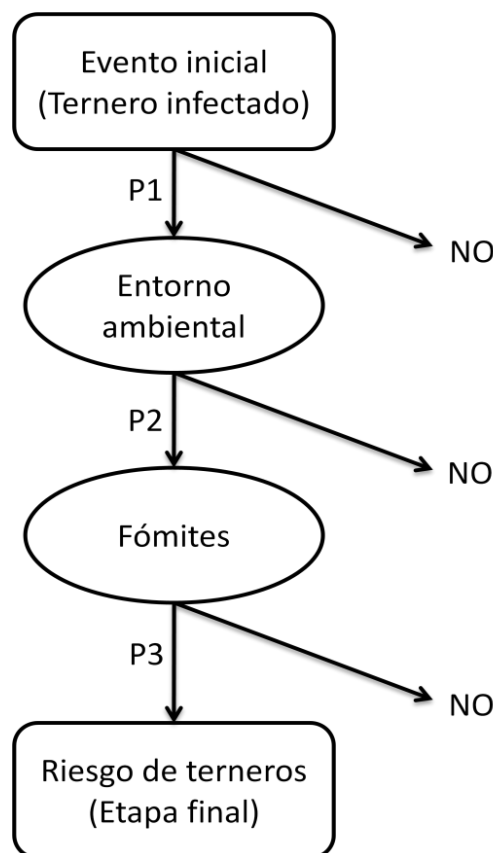
El modelo de Covello y Merkhofer (1993) permite esquematizar la dinámica de *C. parvum* en cuatro escenarios diferentes, incluyendo la presencia de formas infectantes desde su eliminación por parte del ternero, pasando por la contaminación ambiental, la presencia de fómites y el riesgo de infección de un ternero sano. Las siglas P1, P2 y P3 son indicativas de la probabilidad de infección en cada etapa y “NO” de la ausencia del riesgo (Figura 11) (Nydham y Mohammed, 2005).

En la primera etapa (P1) se incluyen elementos como la edad y condiciones climáticas, además de las condiciones de manejo que implican la retirada de las heces, condiciones de la cama, ventilación, limpieza, empleo de sustitutos lácteos,

número de terneros y vacas en producción y finalmente la distancia entre la zona donde se ubican los terneros y el pozo séptico. Estos elementos están ligados a la contaminación de un segundo escenario, en caso de no haber un manejo adecuado en el evento inicial. El modelo se interrumpe en ese momento si el control es adecuado.

En la segunda etapa (P2) desempeñan un papel importante el tipo de suelo y paredes o la presencia de roedores. Un control preventivo y el manejo adecuado de estos elementos serán determinantes para evitar que se llegue a la etapa de fómites, que pueden llegar a desempeñar un papel importante en el proceso de diseminación de este microorganismo. Si se llega a la etapa P3 se habrá producido la contaminación de diferentes zonas, comederos, bebederos y otros elementos como el suelo y paredes. La ausencia de desinfección permitirá llegar al último escenario, con la consiguiente infección de un animal sano (Nydam y Mohammed, 2005).

**Figura 11** Modelo que describe la dinámica de infección por *C. parvum* en terneros lactantes



**Modificado de** Nydam y Mohammed (2005).

### 7.1.2 Ganado porcino

La infección por *Cryptosporidium* en ganado porcino tiene distribución cosmopolita y se ha descrito en cerdos de diferentes edades, aunque la parasitación es más frecuente durante las fases de transición y cebo, cuando los animales tienen entre 1 y 3 meses (Lin y col., 2015). De hecho, los resultados de infecciones experimentales demuestran que los lechones ya son receptivos durante el primer mes de vida (Enemark y col., 2003a, b), pero los valores de prevalencia más elevados en infecciones naturales se registran en cerdos mayores de 1 mes y hasta los 6 meses de vida (Quílez y col., 1996; Atwill y col., 1997; Maddox-Hyttel y col., 2006; Vítovec y col., 2006). La infección se puede manifestar con diarrea grave, pérdida de peso e incluso la muerte, aunque en muchas ocasiones no hay signos clínicos asociados (Lin y col., 2015).

Las razones que justifican el retraso de la infección hasta después del destete en esta especie animal no se conocen con certeza. Algunos autores han señalado la baja frecuencia de parasitación de las madres con las que conviven los lechones como factor más probable (Quílez y col., 1996), mientras que otros indican la posible inmunidad lactogénica protectora que éstas les transmiten (Tzipori, 1985; Sanford, 1987). Cabe destacar que algunos estudios no han observado diferencias significativas en la prevalencia entre animales jóvenes y adultos, lo que sugiere que las cerdas pueden ser una fuente de infección para los lechones (Chen y Huang, 2007).

Los estudios sobre factores de riesgo asociados a la infección por *Cryptosporidium* en las granjas porcinas son escasos y ofrecen resultados controvertidos. En California, Atwill y col. (1997) encontraron una relación estadísticamente significativa entre el tamaño de la explotación y el número de animales infectados, mientras que Hamnes y col. (2007) no observaron asociación entre ambas variables. Estos últimos investigadores tampoco observaron una posible estacionalidad en la eliminación de ooquistes por parte de los cerdos parasitados, circunstancia que justifican por el hecho de que las granjas porcinas en Noruega se realizan bajo cubierta y con condiciones controladas, por lo que no se ven afectadas por las estaciones. Por el contrario, Lin y col. (2015) encontraron que la parasitación



es más prevalente en otoño en las granjas porcinas de China, mientras que Maddox-Hyttel y col. (2006) observan un incremento durante el invierno.

### 7.1.3 Humanos

*Cryptosporidium* es uno de los microorganismos responsables de la enfermedad diarreica aguda, patología que según la OMS ocasiona la muerte de uno de cada diez niños durante los primeros cinco años de vida y causa en torno a 800.000 fallecimientos anuales (Kotloff y col., 2013; Striepen, 2013). La criptosporidiosis humana está presente en todo el mundo, aunque es más frecuente en países en vías de desarrollo donde la pobreza y las deficiencias higiénicas y en infraestructuras sanitarias facilitan su difusión (Savioli y col., 2006; Oluma y col., 2007).

Las estimaciones señalan que en torno al 6% de los casos de enfermedad diarreica en personas inmunocompetentes están causados por *C. parvum*, aunque la cifra asciende al 12% en niños en países en vías de desarrollo, donde este protozoo es el segundo patógeno más frecuentemente asociado a diarrea y fallecimientos en niños menores de 2 años, después de los rotavirus (Kotloff y col., 2013; McNair y Mead, 2013). En los Estados Unidos se declaran anualmente en torno a 8.500 casos de criptosporidiosis, aunque se estima que la cifra de infectados puede ascender a 748.000 casos (Painter y col., 2016).

Las vías de transmisión de la criptosporidiosis en población humana son diversas. La transmisión directa persona-persona es una forma frecuente de contagio y se considera responsable de los casos esporádicos y brotes descritos en guarderías, centros escolares, familias, o instituciones sanitarias como hospitales o centros de día, donde también puede darse transmisión nosocomial (Cruickshank y col., 1988; Hannah y Riordan, 1988; Ortega y col., 2006). El contacto con animales parasitados también es otra vía de infección, responsable de los casos detectados entre veterinarios, ganaderos y personas que trabajan o visitan granjas-escuela (Fayer, 2004; Xiao y Ryan, 2004).

La ingestión de alimentos o agua contaminada ha dado lugar a masivos brotes de la enfermedad en los cinco continentes (Alves y col., 2006; Austin y col., 2012). De hecho, el número de casos relacionados con agua se ha incrementado durante los

últimos años, lo que ha llevado a considerar la criptosporidiosis como enfermedad emergente (Broglia y col., 2008). Por ejemplo, en Estados Unidos se produjeron 143 brotes hídricos entre 1983 y 2007, de los cuales el 10,5% fueron debido a la ingesta de agua potable y 89,5% a la ingestión accidental de aguas recreacionales, en su mayoría agua tratada de piscinas (Yoder y Beach, 2010).

El mayor brote hídrico de criptosporidiosis registrado hasta el momento también tuvo lugar en EEUU (Milwaukee, 1993), resultando afectadas más de 400.000 personas. La contaminación de la cuenca hidrográfica por parte de explotaciones ganaderas fue sugerida inicialmente como probable fuente de contagio, aunque al genotipar muestras obtenidas durante el brote se pudo demostrar que la contaminación tenía origen humano (Rossle y Latif, 2013). El coste de este brote fue estimado en más de 96 millones de dólares, como consecuencia tanto de los gastos médicos como de las pérdidas productivas por bajas laborales (Corso y col., 2003).

La ingesta de alimentos contaminados también ha ocasionado varios brotes de criptosporidiosis en humanos, aunque son mucho menos numerosos que los de etiología hídrica (Cook y col., 2006; Smith y col., 2006a, 2006b; Smith y Cook, 2009; Robertson y Chalmers, 2013;). Se han identificado ooquistes en diversos vegetales de consumo crudo, como lechugas, cilantro, manzanas, tomates, pepinos o zanahorias, que pudieron resultar contaminados tras el riego o fertilización con estiércol o aguas residuales, o durante su posterior manipulación (Ortega y col., 1991; Fayer y col., 2000; Rossle y Latif, 2013). Asimismo, se han encontrado ooquistes de *Cryptosporidium* en moluscos filtradores como ostras, mejillones y almejas, que pueden resultar infectados tras la contaminación de las aguas de cultivo por vertidos de aguas residuales de origen humano o animal (Graczyk y col., 1997; Fayer y col., 1999, 2000; Gómez-Couso y col., 2005).

## **7.2 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR**

### **7.2.1 Ganado vacuno**

Los estudios moleculares realizados en numerosos países han revelado que el ganado vacuno es receptivo a la infección con diversas especies de *Cryptosporidium*, con valores de prevalencia que presentan importantes variaciones dependiendo de la

zona geográfica o la técnica diagnóstica utilizada (Tabla 5). No obstante, son cuatro las especies más prevalentes y mantienen un patrón de distribución asociado con la edad.

*C. parvum* es la especie responsable de la mayoría de brotes de diarrea neonatal. En los EE. UU. está implicada en el 85% de los casos de criptosporidiosis en terneros lactantes, que se consideran por ello el principal reservorio de esta especie zoonótica en la naturaleza. En terneros ya destetados y novillas, son por el contrario mucho más prevalentes otras dos especies, *C. ryanae* y *C. bovis*, mientras que *C. andersoni* predomina en bovinos adultos asintomáticos (Santín y col., 2004; Fayer y col., 2006; Feltus y col., 2008). Con mucha menos frecuencia se han descrito bovinos infectados por especies adaptadas a otros hospedadores, como *C. suis*, genotipo *C. suis-like*, *C. scrofarum* (=genotipo porcino II), *C. hominis*, *C. felis* y *C. canis* (Santín y Trout, 2008; Xiao y Feng, 2008; Xiao, 2010).

**Tabla 5 Prevalencia de *Cryptosporidium* y especies identificadas en ganado vacuno en diversos países**

País	Prevalencia (Metodología)*	Especies identificadas	Referencia
Argentina	17% (MO)	No se describen	Del Cocco y col., 2008.
Australia	22,3% (PCR)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. ryanae</i> <i>C. scrofarum</i>	Ng y col., 2010.
Brasil	14% (PCR)	<i>C. andersoni</i> <i>C. bovis</i> <i>C. parvum</i>	Paz y col., 2013.
Colombia	22% (MO)	No se describen	Avendaño y col., 2010.
	7% (MO)	No se describen	Montaño y Avendaño., 2012.
China	Leche: 32,3% (PCR) Carne: 26,5% (PCR)	<i>C. andersoni</i> <i>C. bovis</i> <i>C. ryanae</i> <i>Cryptosporidium suis-like genotype</i>	Ma y col., 2014.

País	Prevalencia (Metodología)*	Especies identificadas	Referencia
Dinamarca	27,8% (IFA)	No se describen	Maddox-Hyttel y col., 2006.
	19,5% (ICR) 32,3% (PCR)	<i>C. parvum</i> <i>C. ryanae</i> <i>C. bovis</i> <i>C. andersoni</i>	Helmy y col., 2013.
Egipto	30,2% (MO)	<i>C. parvum</i> <i>C. andersoni</i>	Amer y col., 2010.
	13,6% (MO)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. andersoni</i>	Amer y col., 2013.
	49,2% (MO)	<i>C. parvum</i>	Díaz y col., 2010.
España	14% (IFA)	<i>C. parvum</i>	Castro y col., 2006.
	26,8% (IFA)	No se describen	Quílez y col., 1996.
Francia	92-100% (IFA)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. ryanae</i>	Rieux y col., 2014.
Hungría	49,3% (IFA)	<i>C. parvum</i> <i>C. ryanae</i> (deer-like genotype)	Plutzer y Karanis., 2007.
Irán	18,8% (PCR)	<i>C. parvum</i> <i>C. andersoni</i> <i>C. bovis</i>	Keshavarz y col., 2009.
Japón	50% (ICR) 20% (PCR)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. ryanae</i>	Ichikawa-Seki y col., 2014. Murakoshi y col., 2012.
Malawi	7,8% (MO)	<i>C. parvum</i>	Banda, y col., 2003
Nigeria	16% (PCR)	<i>C. andersoni</i> <i>C. bovis</i> <i>C. rayane</i>	Maikai y col., 2011.
Noruega	12% (IFA)	No se describen	Hamnes y col., 2006.
Nueva Zelanda	25% (IFA)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. andersoni</i>	Shrestha y col., 2014.
Pakistán	25,6% (MO)	<i>C. parvum</i> .	Nassir y col., 2009.
Polonia	17% (PCR)	<i>C. parvum</i> <i>C. andersoni</i> <i>C. bovis</i> <i>C. rayane</i>	Rzeżutka y Kaupke, 2013.

País	Prevalencia (Metodología)*	Especies identificadas	Referencia
República Checa	21,2% (MO)	<i>C. parvum</i> <i>C. andersoni</i> <i>C. bovis</i>	Kváč y col., 2011.
Rumanía	25% (MO)	<i>C. parvum</i>	Imre y col., 2011.
Suecia	52% (IFA)	<i>C. parvum</i> <i>C. andersoni</i>	Silverlås y col., 2009.
	19,2% (PCR)	<i>C. parvum</i>	Santín y col., 2008.
	12,9% (IFA)	<i>C. bovis</i> <i>C. andersoni</i> <i>C. ryanae</i>	
	11,9% (PCR)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. andersoni</i> <i>C. ryanae</i>	Fayer, y col., 2006.
USA	20,2% (PCR)	<i>C. suis</i> <i>C. bovis</i> <i>C. andersoni</i> <i>C. ryanae</i>	Feltus y col., 2008.
	8% (MO)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. ryanae</i>	Szonyi y col., 2010.
	35,5% (IFA)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. andersoni</i> <i>C. ryanae</i>	Santín y col., 2004.
	37,4% (MO)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. ryanae</i>	Thompson y col., 2007.
UK	28% (MO y ELISA)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. ryanae</i>	Brook, y col., 2008.
Unión Estatal de Serbia y Montenegro	60,2% (PCR)	<i>C. parvum</i>	Misic y Abe., 2007.
Vietnam	35,7% (MO)	<i>C. parvum</i> <i>C. andersoni</i>	Nguyen y col., 2007.
Zambia	19,2 % (ELISA)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>	Geurden y col., 2006.

\* MO: Microscopía óptica / ICR: Inmunocromatografía

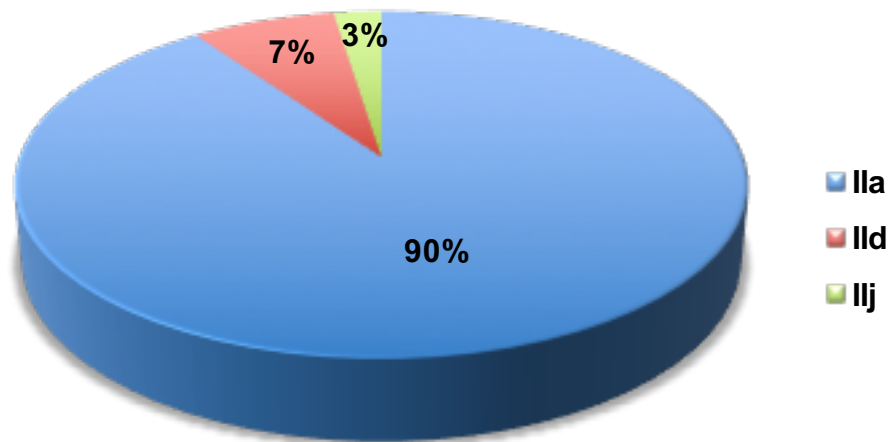
La mayoría de estudios sobre la diversidad intraespecífica de *Cryptosporidium* en ganado vacuno se han centrado en la variabilidad del gen gp60 de *C. parvum*,

teniendo en cuenta que éste es uno de los marcadores más polimórficos y ésta es la especie más prevalente en terneros y la de mayor interés clínico. Tal como se ha comentado en apartados preferentes, hasta el momento se han identificado un total de 14 subfamilias de subtipos (IIa➔IIo) de *C. parvum* (Xiao y Ryan, 2008; Ryan y col., 2014).

Tras la revisión de diversas bases de datos (Elsevier, Scielo, PubMed, SpringerLink y Wiley Library), hemos podido comprobar que se han investigado aislados de *C. parvum* de origen bovino con este marcador en 19 países, habiéndose identificado hasta 122 subtipos. De acuerdo con las observaciones de Couto y col. (2014) y Feng y col. (2013), se observa que la familia IIa es con diferencia la más prevalente, puesto que 110 subtipos (>90%) están asignados a la misma, seguida por la familia IId (9/122) y con menos frecuencia la familia IIj (3/122) (Figura 12). Cabe destacar que tanto la familia IIa como IId están consideradas potencialmente zoonóticas, lo que confirmaría el riesgo que representan los terneros infectados para el hombre.

En la Tabla 6 se recogen los subtipos identificados en diversos estudios, pudiendo comprobarse que el subtipo IIaA15G2R1 es dominante en la mayor parte del mundo (Figura 13), aunque en algunos países europeos (Serbia y Hungría) predomina el subtipo IIaA16G1R1 y en Irlanda del Norte es la variante IIaA18G3R1 la más frecuente (Chalmers y col., 2005; Trotz-Williams y col., 2006; Feng y col., 2007; Geurden y col., 2007; Plutzer y Karanis, 2007; Thompson y col., 2007; Xiao y col., 2007; Wielinga y col., 2008; Brook y col., 2009; Díaz y col., 2010).

**Figura 12 Distribución de las familias GP60 identificadas en aislados de *C. parvum* de ganado vacuno en diferentes países**



**Tabla 6 Subtipos de *C. parvum* identificados en ganado vacuno en diversos países**

País	Familia	Subtipo	Referencia
Alemania	Ila	IlaA15G2R1*	Broglia y col., 2008.
		IlaA14G2R1	
		IlaA17G2R1	
		IlaA18G2R1	
		IlaA21G0R1	
		IlaA22G1R1	
	Ild	IlaA16G1R1	Broglia y col., 2008.
		IldA22G1	
Argentina	Ila	IlaA21G1R1	Del Coco y col., 2008. Tomazic y col., 2013.
		IlaA17G1R1	
		IlaA18G1R1	
		IlaA20G1R1*	
		IlaA21G1R1	
		IlaA22G1R1	
		IlaA23G1R1	Del Coco y col., 2014.
		IlaA18G1R1	
		IlaA20G1R1*	
		IlaA21G1R1	
		IlaA22G1R1	
		IlaA23G1R1	
Australia	Ila	IlaA16G1R1	O'Brien y col., 2008. Ng y col., 2010.
		IlaA19G1R1	
		IlaA15G2R1	
		IlaA18G3R1	
		IlaA17G2R1*	
		IlaA18G3R1	
		IlaA20G3R1	

País	Familia	Subtipo	Referencia
Brasil	Ila	IlaA20G2R1	Couto y col., 2013.
		IlaA20G2R2	
		IlaA19G2R1	
		IlaA19G2R2	
		IlaA18G1R1	
		IlaA18G2R2	
		IlaA16G3R2	
		IlaA14G2R2	
	Ila	IlaA15G2R1*	Amer y col., 2010, 2013; Paz e Silva y col., 2013.
Egipto	Ila	IlaA15G1R1	Helmy y col., 2013
	Ild	IldA20G1*	Amer y col., 2010, 2013; Helmy y col., 2013.
España	Ila	IlaA15G2R1*	Díaz y col., 2010; Navarro-i-Martínez y col., 2011.
		IlaA15G1R1	
		IlaA16G2R1	
		IlaA16G3R1	
		IlaA17G2R1	
		IlaA18G3R1	
		IlaA19G3R1	
		IlaA15G2R1*	
		IlaA13G1R1	
		IlaA15G2R1 *	
		IlaA16G3R1	
		IlaA18G3R1	
		IlaA16G2R1	
		IlaA17G2R1	
		IlaA19G3R1	
	Ild	IldA23G1	Quilez y col., 2008.
		IldA22G2R1	
		IldA23G1	
Estados Unidos	Ila	IlaA15G2R1*	Feng y col., 2007; Santín y col., 2008; Xiao y col., 2007 Xiao y col., 2007.
		IlaA15G2R2	
		IlaA11G2R1 I	
		IlaA17G2R1	
		IlaA18G2R1	
		IlaA19G2R1	
Francia	Ila	IlaA15G2R1*	Rieux y col., 2014.
		IlaA18G1R1*	
Hungría	Ila	IlaA16G1R1*	Plutzer y Karanis, 2007.
		IlaA17G1R1	
		IlaA18G1R1	
	Ild	IldA22G1	Plutzer y Karanis, 2007.
		IldA19G1	
India	Ila	IlaA15G2R1*	Feng y col., 2007.
		IlaA13G2R2	
		IlaA14G2R1a	
		IlaA14G2R1b	



País	Familia	Subtipo	Referencia
Inglaterra y Gales	Ila	IlaA16G3R1	Brook y col., 2009.
		IlaA14G2R1	
		IlaA19G1R1	
		IlaA18G1R1	Chalmers y col., 2005.
		IlaA20G3R1	
		IlaA19G3R1	
		IlaA15G2R1	
Irán	Ila	IlaA15G2R1*	Nazemalhosseini-Mojarad y col., 2011.
		IlaA16G3R1	
	Ild	IldA15G1	Nazemalhosseini-Mojarad y col., 2011.
Irlanda	Ila	IlaA18G3R1*	Thompson y col., 2007.
		IlaA15G2R1*	
		IlaA17G2R1	
		IlaA19G4R1	Ichikawa-Seki y col., 2014.
		IlaA20G3R1	
		IlaA19G3R1	
		IlaA17G3R1	
		IlaA20G5R1	
		IlaA18G2R1	
Japón	Ila	IlaA20G2R1	
Países bajos	Ila	IlaA15G2R1*	Wielinga y col., 2008.
		IlaA17G1R1	
		IlaA16G3R1	
		IlaA13G2R1	
		IlaA14G2R1	
		IlaA17G2R1	
		IlaA18G4R1	
		IlaA18R1	
		IlaA19G2R1	
		IlaA11G2R1	
		IlaA16G1R1	
		IlaA19G1R1	
		IlaA18G1R1	
		IlaA16G2R1	
	Ilij	IlaA18G3R1	
		IlaA21G3R1	
		IlaA12G2R1	
		IlijA24R2	
			Wielinga y col., 2008.
Portugal	Ila	IlaA15G2R1*	Alves y col., 2006.
		IlaA16G2R1	
	Ild	IldA17G1	Alves y col., 2006.
República Checa	Ila	IlaA15G2R1*	Kvác y col., 2011.
		IlaA16G1R1	
		IlaA22G1R1	
		IlaA15G1R1	
Rumanía	Ila	IlaA18G1R1	Imre y col., 2011.
		IlaA15G2R1*	
		IlaA16G1R1	



De manera esporádica se han señalado infecciones naturales en cerdos por otras especies como *C. muris* o *C. tizzery*, junto con otras potencialmente zoonóticas, como *C. parvum*, *C. hominis* o *C. meleagridis*, que convierten a esta especie animal en una fuente de infección potencial para el ser humano (Atwill y col., 1997; Wieler y col., 2001; Vítovec y col., 2006; Hamnes y col., 2007; Suárez-Luengas y col., 2007; Zintl y col., 2007; Johnson y col., 2008; Kváč y col., 2009; Maikai y col., 2009; Chen y col., 2011; Budu-Amoako y col., 2012; Siwila y Mwape, 2012; Nguyen y col., 2013; Zhang y col., 2013; Yui y col., 2014; Lin y col., 2015). En la Tabla 7 se recogen los resultados de prevalencia y especies identificadas en diversos países.

**Tabla 7 Prevalencia de *Cryptosporidium* y especies identificadas en ganado porcino en diversos países**

País	Prevalencia (Metodología)*	Especies identificadas	Referencia
Alemania	1,4% (MO)	<i>C. parvum</i> .	Wieler y col., 2001.
Australia	22,1% (PCR)	<i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> (Pig genotype II).	Johnson y col., 2008.
Canadá	26% (IFA)	<i>C. scrofarum</i> (Pig genotype II). <i>C. suis</i> . <i>C. parvum</i> . <i>C. tizzery</i> (Mouse genotype).	Budu-Amoako y col., 2012.
	33% (MO)	<i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> .	Lin y col., 2015.
China	55,8% (PCR)	<i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> .	Zhang y col., 2013.
	34,4% (MO)	<i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> .	Chen y col., 2011.
Dinamarca	31,9% (IFA)	No describen.	Maddox-Hyttel y col., 2006.
	34,4% (IFA)	No describen.	Quílez y col., 1996.
España	22,5% (MO)	<i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> (Pig genotype II).	Suárez-Luengas y col., 2007.
		<i>C. parvum</i> . <i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> (Pig genotype II). <i>C. muris</i>	Zintl y col., 2007.
Irlanda	11,4% (MO)		
Japón	32,6% (MO)	<i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> .	Yui y col., 2014.
Nigeria	13,6% (MO)	No describen.	Maikai y col., 2009.

País	Prevalencia (Metodología)*	Especies identificadas	Referencia
Noruega	Piara - 31% Camadas - 8,3% (IFA)	<i>C. parvum</i> . <i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> (Pig genotype II).	Hamnes y col., 2007.
República Checa	Lechón-5,7% Desteto-24,1% (MO) 21,1% (MO)	No describen. <i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> (Pig genotype II). <i>C. muris</i>	Vítovec y col., 2006. Kvác y col., 2009.
Suiza	Lechón-10,3% Desteto-15% Ceba-19,2% (PCR)	No describen.	Schubnell y col., 2016.
U.S.A	5,4% (IFA)	<i>C. parvum</i> .	Atwill y col., 1997.
	1,6% (IFA, PCR)	<i>C. scrofarum</i> <i>C. suis</i>	Rodriguez-Rivera y col., 2016.
Vietnam	14,5% (MO)	<i>C. suis</i> . <i>C. scrofarum</i> (Pig genotype II).	Nguyen y col., 2013.
Zambia	44,2% (IFA)	No describen.	Siwila y Mwape, 2012.

\* MO: Microscopía óptica

### 7.2.3 Humanos

Los estudios moleculares con aislados de *Cryptosporidium* de origen humano han demostrado que la mayoría de casos están producidos por dos especies, *C. hominis* y *C. parvum*, cuyo predominio es variable dependiendo de la zona geográfica. La primera parece ser más prevalente en algunos países europeos como Dinamarca, Holanda o España, así como Estados Unidos, Australia o Japón (Peng y col., 1997; Morgan y col., 1998; Sulaiman y col., 1998; Ong y col., 1999; Enemark y col., 2002; Xiao y col., 2004; Xiao y Ryan, 2004; Llorente y col., 2007; Wielinga y col., 2008). Por el contrario, *C. parvum* predomina en otras zonas de Europa como Irlanda, Francia, Portugal, Eslovenia o la República Checa, así como países de Oriente Medio, Kuwait, Turquía o Nueva Zelanda (Lowery y col., 1998; Guyot y col., 2001; Alves y col., 2003; Hajdusek y col., 2004; Learmonth y col., 2004; Sulaiman y col., 2005; Šoba y col., 2006; Meamar y col., 2007; Tamer y col., 2007) (Tabla 8).

**Tabla 8 Prevalencia de *Cryptosporidium* y especies identificadas en humanos en diversos países**

<b>País</b>	<b>Prevalencia (Metodología)*</b>	<b>Especies Identificadas</b>	<b>Referencia</b>
Canadá	6,2% (IFA)	<i>C. parvum.</i>	Coklin y col., 2009.
	27,3% (PCR)	<i>C. parvum,</i> <i>C. bovis.</i>	Coklin y col., 2007.
	42% (MO)	No describen	Carreño y col., 2005.
Colombia	46,8% (MO)	No describen.	De Arango y col., 2006.
	7% (MO, ICR)	No describen	Bayona y col., 2011.
Egipto	6,7% (ICR). 49,1% (PCR)	<i>C. parvum.</i> <i>C. hominis.</i> <i>C. bovis.</i>	Helmy y col., 2013.
Emiratos Árabes unidos	19,4% (PCR)	No describen.	ElBakri y col., 2014.
Etiopía	7,9% (MO)	<i>C. parvum.</i> <i>C. hominis.</i>	Adamu y col., 2010.
Guinea Ecuatorial	18,9% (MO, ICR)	<i>C. hominis.</i> <i>C. parvum.</i> <i>C. meleagridis.</i>	Blanco y col., 2009.
India	3,8% (MO)	<i>C. hominis.</i> <i>C. parvum.</i> <i>C. meleagridis.</i>	Sharma y col., 2013.
	11,7% (ELISA)	<i>C. andersoni.</i> <i>C. parvum.</i> <i>C. hominis.</i> <i>C. bovis.</i>	Manzoor y col., 2010.
Indonesia	11,3% (MO)	<i>C. hominis.</i> <i>C. felis.</i> <i>C. meleagridis.</i>	Kurniawan y col., 2013.
Malasia	22,1% (MO)	<i>C. hominis.</i> <i>C. parvum.</i> <i>C. meleagridis.</i> <i>C. felis.</i>	Lim y col., 2011.
Malawi	5% (MO)	<i>C. hominis.</i> <i>C. parvum.</i>	Morse y col., 2003.

País	Prevalencia (Metodología)*	Especies Identificadas	Referencia
Nigeria	9% (PCR)	<i>C. parvum</i> . <i>C. hominis</i> .	Akinbo y col., 2010.
	3% (PCR)	<i>C. parvum</i> . <i>C. hominis</i> .	Maikai y col., 2012.
Perú	29,6% (MO)	<i>C. hominis</i> . <i>C. parvum</i> . <i>C. bovis</i> . <i>C. canis</i> . <i>C. felis</i> .	Cama y col., 2008.
Sudáfrica	18% (PCR)	<i>C. parvum</i> . <i>C. hominis</i> .	Samie y col., 2006.
Zambia	30,7% (IFA)	No describen.	Siwila y col., 2011.

\* MO: Microscopía óptica / ICR: Inmunocromatografía

No obstante y como es lógico, la distribución de especies no es uniforme en cada país, pudiendo observarse variaciones regionales. Por ejemplo, *C. parvum* es más prevalente en algunas zonas de Inglaterra y Gales (McLauchlin y col., 2000; Hunter y col., 2003; Leoni y col., 2006; Zintl y col., 2009; Chalmers y col., 2011), pero Nichols y col. (2006) constataron el predominio de *C. hominis* en otro estudio, especialmente en turistas que habían viajado al extranjero. Algo similar sucede en los Estados Unidos, donde la mayoría de autores concluyen que *C. hominis* es más frecuente, aunque Feltus y col. (2006) comprobaron que el 90% de casos humanos en el estado de Wisconsin, zona predominantemente rural con elevada densidad de ganado vacuno, eran causados por *C. parvum* (Lucio-Forster y col., 2010).

Entre las especies de *Cryptosporidium* minoritarias en el hombre cabe destacar tres potencialmente zoonóticas, como son *C. meleagridis*, *C. felis* o *C. canis*. Su presencia ha sido denunciada tanto en pacientes inmunodeprimidos como inmunocompetentes de numerosos países europeos (Reino Unido, Francia, Portugal, Italia, Suiza), Estados Unidos, Latinoamérica (Brasil), África (Etiopía, Kenia) o Asia (Camboya), siendo responsables de hasta el 20% de casos en niños y pacientes en SIDA en países como Perú y Tailandia (Morgan y col., 1999, 2000; Pieniazek y col., 1999; McLauchlin y col., 2000; Alves y col., 2001a, b; Guyot y col., 2001; Xiao y col., 2001; Cacciò y col., 2002; Gatei y col., 2002, 2003, 2006; Tiangtip y Jongwutiwes, 2002; Cama y col., 2003, 2008; Leoni y col., 2006; Meireles, 2010; Helmy y col., 2013; Adamu y col., 2014; Moore y col., 2016).

Finalmente, cabe señalar el hallazgo esporádico de especies menos relevantes en el ser humano, como *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei* y los genotipos caballo, ardilla I y mofeta (Xiao, 2010; Waldron y col., 2011; Elwin y col., 2012; Ng y col., 2012; Rašková y col., 2013; Liu y col., 2014; Ryan y col., 2014).

La mayoría de casos humanos de origen zoonótico han sido producidos por *C. parvum* y se han asociado al contacto con terneros o pequeños rumiantes en ganaderos, veterinarios o niños que habían visitado granjas escuela (Chalmers y Giles, 2010; Gormley y col., 2011; Cacciò y col., 2013; Ryan y col., 2014; Utsi y col., 2016). Menos relevante parece ser *C. meleagridis*, especie para la que algunos estudios han involucrado las aves como fuente de contagio (Chalmers y col., 2011; Silverlås y col., 2012). Lo mismo sucedería con los perros y gatos, hospedadores que plantearían bajo riesgo de contagio para el ser humano a tenor del escaso número de casos producidos por *C. canis* y *C. felis*, preferentemente adaptadas a estos hospedadores (Lucio-Forster y col., 2010). Otras especies potencialmente zoonóticas son *C. suis*, *C. ubiquitum*, *C. ryanae* o *C. cuniculus*, esta última considerada la tercera más común en pacientes con diarrea en Reino Unido, donde también fue responsable de un brote hídrico (Cacciò y col., 2005; Chalmers y col., 2011; Koehler y col., 2014; Martínez-Ruiz y col., 2016; Moore y col., 2016).

Al igual que sucede con otros hospedadores, el gen GP60 es el más frecuentemente utilizado para investigar la diversidad intraespecífica de aislados de *Cryptosporidium* de origen humano. La mayoría de estudios se han centrado en las dos especies mayoritarias (*C. hominis*, *C. parvum*), habiéndose identificado un total de 109 subtipos en 19 países, según hemos constatado tras la revisión de diversas bases de datos (Elsevier, Scielo, PubMed, SpringerLink y Wiley Library) y tal como se refleja en la Tabla 9.

**Tabla 9** Subtipos de *C. hominis* y *C. parvum* identificadas en humanos en diversos países

País	Familia	Subtipo	Referencia
Australia	Ia	IaA23	O'Brien y col., 2008 Ng y col., 2010.
		IbA5G2T3	
	Ib	IbA9G2	
		IbA9G2T1	
		IbA10G2*	
	Id	IdA15G1	
		IdA16	
		IdA25	
	Ie	IeA11G3T3	
		IeA12G3T3	
	If	IfA11G1T1	
		IfA12G1	
	Ig	IgA17	
		IgA19	
	IIa	IIaA15G2R1	
		IIaA17G2R1	
		IIaA18G3R1*	
		IIaA19G2R1	
		IIaA19G3R1	
		IIaA19G4R1	
		IIaA20G3R1	
		IIaA21G2R1	
	IIc	IIcA5G3a	
China	IIId	IIIdA15G1	Wang y col., 2011.
	Ia	IaA9R3	
	Ib	IbA16G2	
		IbA19G2	
		IbA20G2*	
Egipto	Id	IdA21	Helmy y col., 2013 Amer y col., 2010, 2013; Helmy y col., 2013.
	IIa	IIaA15G1R1	
		IIaA15G2R1	
	IIId	IIIdA20G1*	
España	Ia	IaA21G1R1	Navarro-i-Martinez y col., 2011.
		IaA24R3	
	Ib	IbA10G2R2	Ramo y col., 2015.
		IbA10G2*	
	IIa	IIaA13G1R1	Díaz y col., 2010; Navarro-i-Martinez y col., 2011.
		IIaA15G1R1	
		IIaA15G2R1	
	IIc	IIcA5G3R2	Ramo y col., 2015.
Estados Unidos	IIId	IIIdA22G2R1	Navarro-i-Martinez y col., 2011.
		IIIdA23G1	
	IIa	IIaA15G2R1	Feng y col., 2013.



País	Familia	Subtipo	Referencia
	lb	lbA9G3	
Etiopía	Ila	IlaA15G2R1* IlaA16G2R1 IlaA16G1R1	Adamu y col., 2010.
	la	laA18R3 laA19R3 laA21R3 laA26R3 laA27R3 laA29G1T3R3	
India	lb	lbA9G3	
	ld	ldA14G1 ldA15G11 ldA16G1	Sharma y col., 2013.
	le	leA11G3T2 leA11G3T3*	
	lf	lfA13G1	
	llc	llcA5G3*	
	lld	lldA14G1 lldA15G1	
	lle	lleA7G1	
	ld	ldA20	
	lf	lfIA22G1	
Irán	Ila	IlaA15G2R1* IlaA16G3R1	Nazemalhosseini-Mojarad y col., 2011.
	lld	lldA15G1 lldA18G1 lldA20G1a lldA21G1a lldA26G1	
Jamaica	lb	lbA10G2*	
	le	leA12G3T3	Gatei y col., 2008.
	llc	llcA5G3d	
	lb	lbA6G3 lbA9G3 lbA10G2 lbA20G2	
Jordania	ld	ldA21 ldA24*	
	Ila	IlaA15G1R1 IlaA20G3R1	Hijjawi y col., 2010.
	llc	llcA5G3a lldA14G1	
	lld	lldA20G1* lldA24G1 lldA29G1	

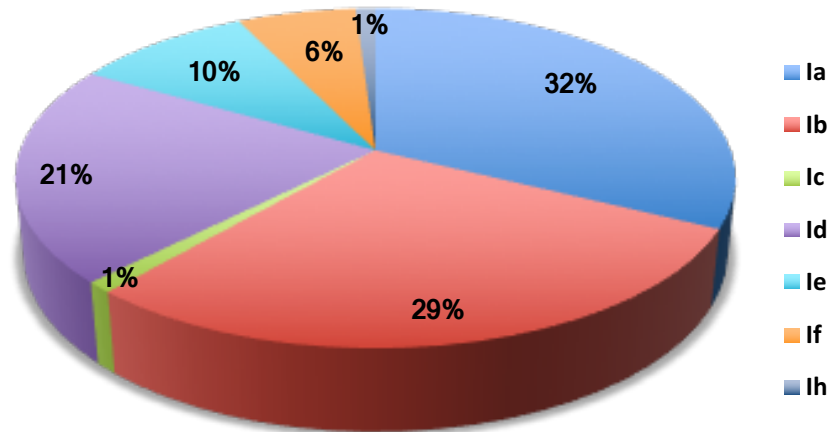
País	Familia	Subtipo	Referencia
Kuwait	lb	lbA9G3 lbA10G2	Sulaiman y col., 2005.
	ld	ldA14	
	le	leA11G3T3	
	lla	llaA15G1R1 llaA15G2R1	
	llc	llcA5G3a	
	lld	lldA20G1* lldA18G1	
	llf	llfA6	
	la	laA14R1	
Malasia	lb	lbA10G2R2	Lim y col., 2011.
	ld	ldA15R2	
	le	leA11G2T3R1	
	lf	lfA11G1R2	
	lld	lldA15G2R1	
Méjico	la	laA15R3 laA14R3*	Valenzuela y col., 2014.
	lb	lbA10G2	
	ld	ldA17	
	le	leA11G3T3*	
	lla	llaA15G2R1 llaA16G1R1	
Nigeria		laA14R3 laA16R3 laA24R3 laA25R3 laA23R3	Akinbo y col., 2010.
	la	laA25R3 laA18R2 laA22R2 laA24R2 laA25R2 laA28R2 laA21R1	Maikai y col., 2012.
			Molloy y col., 2010.
	lb	lbA13G3	Akinbo y col., 2010.
	le	leA11G3T3	
	llc	llcA5G3h	
	lle	lleA10G1	
	lh	lhA14G1	Molloy y col., 2010.
	lb	lbA10G2*	Fournet y col., 2012; Wielinga y col., 2008.
	ld	ldA17 ldA14	Wielinga y col., 2008.
	lc	lcA5G3R2	
	lla	llaA15G2R1* llaA17G1R1	
		lldA15G1	
	lld	lldA16G1 lldA18G1	
Países Bajos			Wielinga y col., 2008.

País	Familia	Subtipo	Referencia
Perú	Ia	IaA11R4	Cama y col., 2008.
		IaA12R4	
		IaA13R4	
		IaA13R7	
		IaA14R6	
	Ib	IaA15R3	
		IbA10G2*	
		IdA10	
	Id	IdA15	
		IdA20	
	Ie	IeA11G3T3	
	Ilc	IlcA5G3a*	
		IlcA5G3b	
		IlcA5G3c	
Portugal	Ia	IaA19R3	Alves y col., 2006.
	Ib	IbA10G2*	
	Id	IdA15	
	Ie	IeA11G3T3	
	If	IfA14G1	
	IIa	IIaA15G2R1*	
		IIaA16G2R1	
	IIb	IIbA14	
	Ilc	IlcA5G3	
		IIdA17G1	
	IId	IIdA19G1	
		IIdA21G1	
		IIdA22G1	
Reino unido	Ib	IbA10G2*	O'Brien y col., 2008; Chalmers y col., 2005. Chalmers y col., 2005.
		IbA9G3	
		IbA12G3T3	
Suiza	Ib	IbA10G2	O'Brien y col., 2008.
	Id	IdA15G1	
	IIa	IIaA18G3R1	
	IId	IIdA22G1	

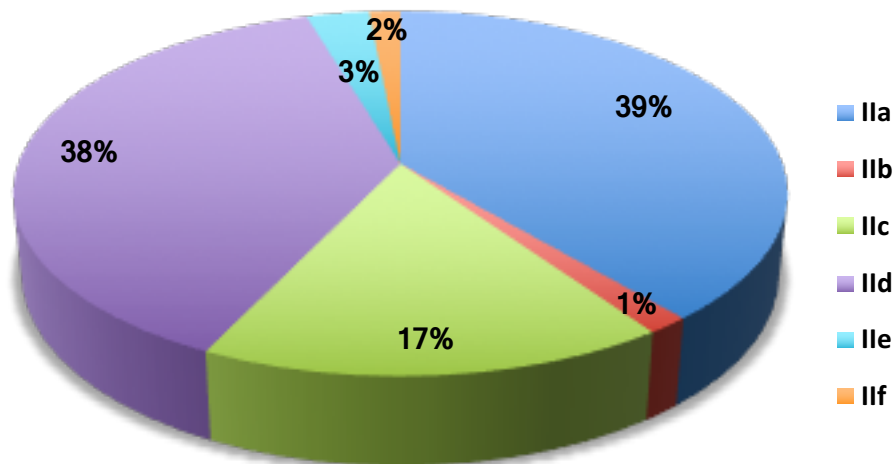
\* Subtipo encontrado son mayor frecuencia

*C. hominis* ha sido identificado en 17 países, con presencia de 7 familias y 67 subtipos, siendo las familias Ia y especialmente Ib las más prevalentes (Figura 14). Por su parte, *C. parvum* ha sido descrito en 18 países, con un total de 6 familias y 44 subtipos, siendo en este caso predominantes las familias zoonóticas IIa y IId (Figura 15). Entre las variantes más prevalentes en la mayoría de continentes destacan con diferencia los subtipos IbA10G2 de *C. hominis* y IIaA15G2R1 de *C. parvum*, aunque ambos son sustituidos por otros muchos subtipos que predominan en determinadas zonas geográficas (Figura 16) (do Couto y col., 2014; Feng y col., 2013).

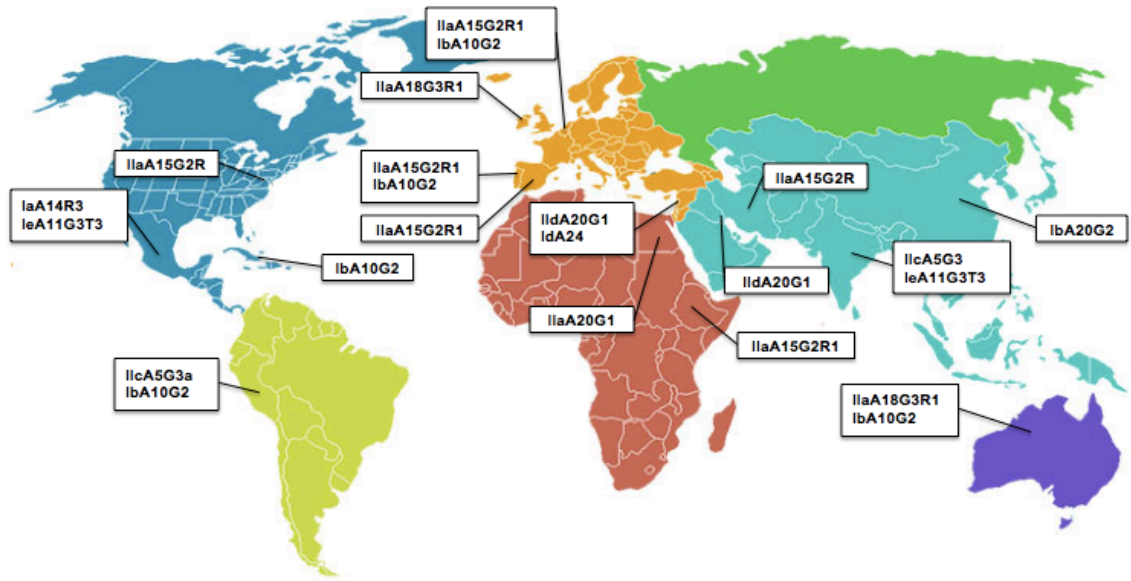
**Figura 14 Distribución de las familias GP60 identificadas en aislados de *C. hominis* de humanos en diversos países**



**Figura 15 Distribución de las familias GP60 identificadas en aislados de *C. parvum* de humanos en diversos países**



**Figura 16** Distribución continental de los subtipos de *C. parvum* y *C. hominis* más prevalentes en humanos en diversas zonas del planeta



## 8 CONTROL

### 8.1 TRATAMIENTO

En el momento actual no existen fármacos eficaces en el tratamiento de la criptosporidiosis en medicina humana o veterinaria. Sólo algunos de los numerosos compuestos evaluados *in vivo* e *in vitro* durante los últimos años, entre los que se incluyen antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios o antivirales, han proporcionado eficacia parcial en la remisión de los síntomas o la eliminación de ooquistes en las heces. De hecho, tanto la comunidad científica como la industria farmacéutica están perdiendo el interés en el desarrollo de terapias contra un microorganismo tan resistente, aunque está claro que la criptosporidiosis sigue siendo un problema médico y veterinario por los que la investigación en esta línea debe continuar, especialmente por su gravedad en individuos inmunodeprimidos (Sterling, 2000).

Los factores que explican la escasa eficacia de los fármacos frente a *Cryptosporidium* no se conocen con certeza, aunque se han relacionado con aspectos estructurales que dificultan que el fármaco alcanza el parásito, como la posición exclusiva que ocupa en la célula hospedadora, en localización intracelular pero extracitoplasmática, así como características bioquímicas por las que actualmente

este protozoo se sitúa más cerca de los Gregarina que de los coccidios (Ryan y col., 2016; Thompson y col., 2016).

En medicina veterinaria, el único fármaco comercializado específicamente para el tratamiento de la criptosporidiosis en terneros en algunos países europeos es el lactato de halofuginona. Su administración preventiva desde el primer día de vida a dosis de 100 µg/kg durante 7 días consecutivos no impide la infección en todos los animales, pero reduce la gravedad en aquéllos que enferman, así como la excreción ooquistica (Villacorta, y col., 1991; Causape y col., 1999; Lefay y col., 2001; Giadinis y col., 2007; Klein, 2008). Un resultado similar proporciona el decoquinato, que también ha demostrado tener eficacia parcial en pequeños rumiantes como preventivo a dosis de 2,5 mg/kg (Mancassola y col., 1997). Un estudio comparativo con ambas moléculas en terneros demostró que no previenen totalmente la infección, aunque el decoquinato incrementó la ganancia media diaria de peso de los animales y la halofuginona redujo significativamente la excreción de ooquistes (Lallemand y col., 2006).

Los fármacos aprobados para el tratamiento de las criptosporidiosis en humanos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) se describen en la Tabla 10. Entre ellos se incluye la azitromicina, un macrólido utilizado en infecciones respiratorias y gastroentéricas, cuyos resultados en el tratamiento de la criptosporidiosis son controvertidos. Algunos estudios registran la remisión de síntomas y reducción en la eliminación de ooquistes en más del 90% de pacientes, mientras que otros señalan que no hay diferencias entre pacientes tratados y aquéllos en que la infección se resuelve de forma espontánea (Pantenburg y col., 2009).

La paromomicina, un aminoglicósido oral inicialmente utilizado para el tratamiento de la amebiasis, fue el primer medicamento evaluado en humanos con criptosporidiosis. Aproximadamente el 50% de los pacientes tratados siguen eliminando el parásito y continúan con síntomas, aunque puede resultar más eficaz si se combina con un inhibidor de proteasas o con IL-12. Este medicamento no se absorbe, razón por la cual no es eficaz en la criptosporidiosis biliar que pueden desarrollar los pacientes con SIDA (Pantenburg y col., 2009; Rossignol, 2010; Rossle y Latif, 2013).

La Nitaxozanida es el único fármaco sometido a un diseño completo y bien estructurado para el tratamiento de la criptosporidiosis, estando aprobado

desde 2006 por parte de la FDA para su uso en pacientes no infectados por el VIH (Pantenburg y col., 2009; Rossignol, 2010; Rossle y Latif, 2013). Este medicamento fue diseñado originalmente como antihelmíntico de uso veterinario, aunque estudios posteriores demostraron su actividad como antibiótico de amplio espectro, antihelmíntico, antiviral y antiprotozoario. La tasa de remisión de síntomas tras el tratamiento en pacientes inmunocompetentes con criptosporidiosis oscila entre el 67 y 93%, aunque puede persistir la eliminación de ooquistes y no resulta eficaz en pacientes inmunodeficientes (Pantenburg y col., 2009; Rossle y Latif, 2013).

**Tabla 10 Fármacos aprobados para el tratamiento de la criptosporidiosis en humanos por la Administración para los Alimentos y Medicamentos de los EEUU (FDA)**

Fármaco	Limitación
Nitaxozanida <sup>1</sup>	Eficacia entre 56–96% en pacientes sanos No eficaz en pacientes con SIDA avanzado Fármaco costoso y su disponibilidad es limitada.
Paromomicina	Eficacia limitada en pacientes con SIDA
Azitromicina	No eficaz en pacientes con SIDA
Rifaximina	Eficacia limitada en pacientes con SIDA
Rifabutina	Eficaz en la prevención de la criptosporidiosis en pacientes infectados por <i>Mycobacterium avium</i> .
Inhibidores de proteasas (VIH) <sup>2</sup>	Asociados a la remisión de criptosporidiosis en pacientes con SIDA. Eficacia parcial frente a la criptosporidiosis en modelos murinos.

<sup>1</sup> No aprobado para uso en pacientes VIH+

<sup>2</sup> Aprobado su uso para pacientes VIH+

**Modificada de:** Pantenburg y col. (2009); Rossignol (2010); Rossle y Latif (2013); Checkley y col. (2015)

Debido a que no existe un fármaco totalmente eficaz en el tratamiento de esta enfermedad, es necesario proporcionar al paciente terapia de soporte, consistente en la administración de electrolitos y fármacos antidiarreicos (Rossle y Latif, 2013). La terapia de soporte debe contemplar el uso de líquidos con sodio, potasio, bicarbonato y glucosa. Los sueros a base almidón suelen proporcionar calorías con menos osmolaridad y una respuesta más eficaz que aquéllos que contienen glucosa (Pantenburg y col., 2009). La rehidratación debe llevarse a cabo por vía oral, en algunos casos vía parenteral. La terapia también debe incluir agentes que disminuyan la motilidad para que se facilite la absorción de fluidos y nutrientes. Finalmente, algunos autores sugieren el suministro de probióticos (*Lactobacillus* spp., *Bacillus*

*subtilis*) que son antagonistas de los microorganismos patógenos y permiten reponer la flora intestinal, junto con sustancias astringentes y protectores de mucosa como caolín o pectina (Vergara-Castiblanco y Quílez, 2004; Pantenburg y col., 2009).

En las explotaciones de rumiantes, una medida de utilidad para la prevención y control de la criptosporidiosis es el suministro de calostro durante las primeras horas de vida de los animales. Su valor ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista de los anticuerpos, aunque otros componentes del mismo también podrían tener efecto protector (Tessema y col., 2009). Entre éstos se incluye un lípido que inhibe la adhesión de los esporozoítos a las células hospedadoras, el cual se ha estudiado como posible tratamiento de la criptosporidiosis humana y animal (Perryman y col., 1999; Schmidt y Kuhlenschmidt, 2008). Esta molécula, denominada Lípido Inhibitorio de Adherencia del Esporozoíto (SIL) se ha caracterizado como ácido oléico, un ácido graso monoinsaturado aislado en el calostro en forma esterificada de di- y triglicérido. Se ha demostrado que el SIL se produce durante la digestión del calostro, muy probablemente por la actividad enzimática de la lipasa intestinal, lo que ofrece una disponibilidad para ejercer su actividad antiadherente diferente a la proporcionada tras la administración de ácido oléico comercial purificado (Schmidt y Kuhlenschmidt, 2008).

## **8.2 INMUNOPREVENCIÓN**

El desarrollo de vacunas ha sido una de las mayores contribuciones de la inmunología a la medicina y salud pública (Arnon y Ben-Yedidia, 2003). La vacunación es una de las formas más eficientes para combatir enfermedades infecciosas y ha permitido erradicar del mundo graves patologías humanas como la viruela y otra que están en proceso de erradicación como el sarampión o la poliomielitis. La protección frente a los microorganismos puede ser lograda mediante inmunización pasiva o activa. La primera se adquiere mediante el aporte de anticuerpos al individuo, lo que proporciona protección rápida, aunque transitoria. En contraste, la segunda se consigue cuando el sistema inmune es activado por la exposición natural al patógeno o por vacunación, lo que genera una respuesta inmune primaria que se incrementará con exposiciones ulteriores al mismo antígeno (Moody, 2013).



El desarrollo de una vacuna frente a la criptosporidiosis resultaría muy beneficioso, tanto en medicina veterinaria, para prevenir los brotes de diarrea neonatal asociados a esta patología en las granjas de rumiantes, como en medicina humana, especialmente en pacientes inmunocomprometidos que son más susceptibles a desarrollar la forma crónica en lugar de recuperarse. La importancia de la respuesta inmune en la prevención y recuperación de la infección por *Cryptosporidium* ha estimulado la investigación para definir las características de los antígenos que inducen respuestas protectoras, algunos de los cuales están indicados en la Tabla 11 (Petersen y col., 1992; Boulter-Bitzer y col., 2007). No obstante, por el momento no se encuentra disponible ninguna vacuna que contribuya al control de la criptosporidiosis.

**Tabla 11 Antígenos de *Cryptosporidium* estudiados como candidatos para elaborar una vacuna frente a la criptosporidiosis**

Tipo de vacuna	Antígeno	Resultado	Referencia
ADN	ADN-CP15	Protección mediante la reducción del periodo de excreción y reducción en la cantidad de ooquistes eliminados durante la fase aguda de la criptosporidiosis.	Sagodira y col., 1999.
Vector	CP23; CP40	Inhibición parcial de la infección por esporozoitos	Benitez y col., 2009.
Recombinante	CP15/60	Aunque las vacunas de ADN no pueden inhibir por completo la infección de <i>C. parvum</i> , el uso de plásmidos recombinantes puede inducir respuesta inmune específica.	He y col., 2004.
Vector	Cp23	Inducción de Anticuerpos neutralizantes.	Takashima y col., 2003.
Vector	Cp23	Inducción de respuesta inmune humoral y celular.	Bonafonte y col., 2000.
ADN	Cp2	Inducción de respuesta inmune humoral y celular.	Benitez y col., 2011.

Entre los antígenos que actúan como blanco del sistema inmune y que pueden ser buenos candidatos para la elaboración de vacunas cabe destacar dos con peso molecular de 15 KDa y 23 KDa, ambos reconocidos por anticuerpos séricos de humanos y de diversas especies animales (ratón, conejos, terneros, cabritos, cerdos).

El antígeno de 15 KDa (CP15) se localiza en la superficie del esporozoíto y es el principal antígeno reconocido por la inmunoglobulina intestinal (IgA) en ratones infectados por vía oral con *C. parvum*. De hecho, se ha encontrado una correlación entre la producción de IgA intestinal anti-15KDa y la adquisición de resistencia a la criptosporidiosis en cabritos. Otro estudio en ratones mostró que una IgA monoclonal anti-15KDa induce protección cuando se administra por vía oral a ratones recién nacidos (Sagodira y col., 1999).

La síntesis química de péptidos es una herramienta fundamental para la producción de vacunas sintéticas. Los primeros intentos de síntesis se llevaron a cabo en fase líquida, aunque la tecnología ha ganado relevancia y logrado importantes avances desde la introducción de síntesis de fase sólida por Merrifield en 1986. Su principal ventaja es que los productos intermedios se pueden aislar y purificar después de cada paso de la síntesis (Guzmán y col., 2007).

El diseño de vacunas a partir de péptidos sintéticos permite suprimir los efectos tóxicos asociados a otro tipo de vacunas, poniendo el énfasis en los elementos inmunogénicos que a veces el parásito puede esconder (Ben-Yedidia y Arnon, 1997). Los péptidos identificados como epítomos inmunogénicos estimulan intensamente la respuesta inmune cuando se liberan con un adyuvante, tanto la respuesta humoral como celular. Esta respuesta puede además potenciarse si se incluyen múltiples epítomos en misma vacuna (Liljeqvist y Ståhl, 1999) o se utilizan péptidos inmunomoduladores como FSEIAIIHVLHSR (FIS), molécula extraída de la mioglobina del esperma de las ballenas que estimula la producción de linfocitos Th (Prieto y col., 1995).

El principal beneficio de la inmunización con vacunas basadas en péptidos o polipéptidos es la capacidad de inmunizar con una estructura mínima, que consiste en un antígeno bien definido que pueden ser completamente caracterizado con respecto a su antigenicidad e inmunogenicidad, con el fin de estimular una respuesta inmune específica, evitando al mismo tiempo los posibles efectos indeseables. Dado que la inmunogenicidad de los péptidos es baja, el péptido debe ser presentado y por lo general formulado con una adecuada sustancia de vehículo y un adyuvante (Arnon y Ben-Yedidia, 2003).

## 9 ASPECTOS DE LA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EN HUMANOS

*Giardia duodenalis* es un protozoo flagelado que infecta el intestino delgado de una gran variedad de mamíferos, incluido el hombre y numerosas especies animales de abasto y compañía (Ortega-Pierres y col., 2017; Uchôa y col., 2017). En el ser humano, la giardiosis está asociada a un cuadro de diarrea crónica que afecta tanto a individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos. En el año 2005, la OMS incluyó esta enfermedad en la “Iniciativa de Enfermedades Olvidadas”, debido a sus vínculos con la pobreza y la elevada morbilidad que ocasiona en países en vías de desarrollo (Savioli y col., 2006).

El ciclo biológico de *Giardia* presenta dos estadios conocidos como quiste y trofozoíto (Ryan y Cacciò, 2013). La forma infectante son los quistes, que se eliminan de manera intermitente por periodos variables con las heces de los hospedadores infectados, tanto sintomáticos como asintomáticos y pueden permanecer viables en el ambiente durante meses, lo que favorece la persistencia y distribución del parásito (Uchôa y col., 2017). Esta circunstancia unida a la baja dosis infectante, estimada en tan solo 10 quistes, justifica que *Giardia* se encuentre entre las causas más comunes de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo, siendo responsable de más de 280 millones de casos de gastroenteritis cada año (Certad y col., 2017; Kraft y col., 2017).

Taxonómicamente, las especies del género *Giardia* se incluyen en el Phylum Metamonada, Subphylum Trichozoa, Superclase Eopharyngia, Clase Trepomonadea, Subclase Diplozoa y Orden Giardiida (Certad y col., 2017). Actualmente se han descrito seis especies, de las cuales sólo *Giardia duodenalis* ha sido identificada en humanos (Cardona y col., 2013). Dentro de esta especie y en base al polimorfismo de proteínas o ADN, se reconocen 8 grupos filogenéticos distintos también conocidos como ensamblajes (“assemblages”) (A→H). Para su caracterización se han utilizado diversos marcadores, como los genes que codifican la pequeña subunidad ribosomal (SSU-rDNA), la región espaciadora interna transcrita (ITS1-2), la  $\beta$ -giardina (*bg*), triosafosfatasa isomerasa (*tpi*) y el gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (Thompson y Ash, 2016; Faria y col., 2017).

Los ensamblajes A y B son compartidos por el hombre y otras especies de mamíferos y se consideran por tanto zoonóticos, mientras que el resto son más específicos de hospedador. Por ejemplo, hay ensamblajes específicos de cánidos (C y D), ungulados (E), gatos (F), ratas (G) y vertebrados marinos (H) (Ryan y Cacciò, 2013; Kraft y col., 2017). No obstante, esta especificidad no es absoluta y algunos de los anteriores ensamblajes (E) también se han descrito ocasionalmente en humanos (Fink y Singer, 2017).

Las técnicas moleculares también han demostrado la existencia de variaciones genéticas dentro de un mismo ensamblaje, dando lugar a la identificación de sub-ensamblajes que se diferencian por números romanos. Por ejemplo, el ensamblaje A de *G. duodenalis* se divide en cuatro sub-ensamblajes algunos zoonóticos (AI), otros preferentemente antroponótico (AII) y otros exclusivos de animales (AIII y AIV). Por su parte, el ensamblaje B está dividido en cuatro sub-ensamblajes, dos de los cuales (BI, BII) son propios de animales y otros dos (BIII y BIV) exclusivos de humanos (Faria y col., 2017).

Finalmente, cabe destacar que los aislados pertenecientes al mismo sub-ensamblaje no son siempre idénticos. Según Ryan y Cacciò (2013), estas variantes genéticas deberían denominarse genotipos o genotipos multilocus, en caso de utilizar una combinación de varios marcadores para su identificación y describirlos mediante numeración arábica para diferenciarlos de los subensamblajes. Una posible nomenclatura fue propuesta por Cacciò, y col. (2008), que utilizan una clasificación basada en un esquema multilocus, asignando los aislados en primer lugar a un sub-ensamblaje (AI, AII, AIII, etc) y posteriormente a un genotipo (A1, A2, A3, etc) (Tabla 12). Esta nomenclatura puede resultar útil en aislados de origen humano, pero es más difícilmente aplicable a los de origen animal, que tienen una variabilidad muy superior (Ryan y Cacciò, 2013).

Tabla 12 Genotipos multilocus (GMLs) del ensamblaje A de *G. duodenalis*

Subgenotipo	GML	Subtipo			Hospedadores
		<i>gdh</i>	<i>bg</i>	<i>tpi</i>	
AI	AI-1	A1	A1	A1	Humanos, ganado vacuno, búfalo de agua, gato, cerdo, oveja
	AI-2	A5	A5	A5	Gato
AII	AII-1	A2	A2	A2	Humano, gato
	AII-2	A3	A3	A2	Humano
	AII-3	A3	A2	A2	Humano
	AII-4	A4	A3	A2	Humano
	AII-5	A3	A3	A1	Humano
	AII-6	A3	A3	A3	Humano
	AII-7	A3	A3	A4	Humano
AIII	AIII-1	A6	A6	A6	Gamo, jabalí, gato

Modificado de Cacciò y col. (2008); Feng y Xiao (2011).

## 10 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACION SOBRE *Cryptosporidium* Y *Giardia* EN HUMANOS Y ANIMALES EN COLOMBIA

La información disponible sobre la distribución de *Cryptosporidium* y *Giardia* en Colombia no es muy abundante, aunque se han realizado estudios en humanos y animales y también en muestras de origen ambiental, la mayoría con técnicas de microscopía óptica y algunos con herramientas de biología molecular.

Los estudios coprológicos revelan que la prevalencia de *Cryptosporidium* en población infantil es muy variable en diversas zonas geográficas, como Cundinamarca donde asciende al 7%, Bucaramanga (40-42%) o Arauca (46,8%) (Carreño y col., 2005; de Arango y col., 2006; Bayona y col., 2011), valores que son muy superiores a los observados en niños del Amazonas por microscopía (1,9%) y qPCR (1.8%) (Sánchez y col., 2017). Cabe destacar la diversidad genética de los aislados analizados en este último trabajo, donde se identificaron las especies *C. viatorum*, *C. hominis* (subtipos IdA19 y IaA12R8) y *C. parvum* (subtipo IlcA5G3c). El porcentaje es

muy superior cuando se utilizan técnicas serológicas, como el observado por Vergara y col. (2000) en personas residentes en Cali, Medellín, Bucaramanga y Bogotá, donde más del 83% tenían anticuerpos séricos frente a *Cryptosporidium*.

Los estudios coprológicos con muestras fecales de origen animal también señalan valores de prevalencia de *Cryptosporidium* muy variables. En terneros lactantes, se han publicado datos en Cundinamarca (4.8 - 38,3%), el Valle de Chiquinquirá (7%), Antioquía (38,3%) o Caldas (13,7%) (Avendaño y col., 2010; Hernández-Gallo y Cortés-Vecino, 2012; Montaña y Avendaño, 2012; Ocampo y col., 2012; Pardo y Oliver, 2012; Cadavid-Betancur y col., 2014). En animales de compañía, cabe señalar el estudio realizado en perros de Tunja por Rodríguez y col., (2009), quienes denuncian una prevalencia de 16,4%, cifra muy similar a la observado en gatos de Bogotá (13%) por Santín y col. (2006), con predominio de *C. felis* (5/6) sobre *C. muris* (1/6). Los estudios serológicos arrojan de nuevo cifras de seroprevalencia muy superiores a las anteriormente señaladas, como la obtenida por Vergara y col. (2001) en vacas de la región de Cundinamarca (53,3%).

Por lo que respecta a la prevalencia de *Giardia*, la mayoría de estudios coprológicos publicados se centran en población infantil y denuncian la infección en Bogotá (6,3%), Cundinamarca (12.8-15,2%), Cali (22-30%), Cauca (14,9%), Tunja (12,4%), Antioquía (entre 24,7-27,6%) o Turbaco, municipio situado a 10km de Cartagena de Indias (27%) (Wilson y col., 1999; Alvarado y Vásquez, 2006; Manrique-Abril y col., 2006; Tabares y González, 2008; Botero-Garcés y col., 2009; Lozano y col., 2009; Boeke y col., 2010; Chaves y col., 2007; Villafañe-Ferrer y col., 2016).

Entre los estudios moleculares destacan el realizado por Ramírez y col. (2015), que mediante la amplificación de tres marcadores (SSU rDNA, *gdh* y *tpi*) identifican el ensamblaje A de *G. duodenalis* en el 3% de los niños (sub-ensamblaje AI 64% y AII 36%), el ensamblaje B en el 90% (99.2% sub-ensamblaje BIV y 0.8% BIII) y e infecciones mixtas (ensamblaje A+B) en el 7% restante. En Ibagué, Rodríguez y col. (2014) detectan *G. duodenalis* en el 11,2% de las muestras, con predominio del ensamblaje A (47.8%) sobre el B (52.2%). Finalmente, cabe mencionar el estudio de Sánchez y col. (2017) en niños del Amazonas, donde identifican *G. duodenalis* por microscopía (23,7%) y qPCR (64,8%), con presencia de los ensamblajes AI, AII, BIII y BIV. Los estudios publicados con aislados de origen animal se circunscriben a la identificación del ensamblaje F de *G. duodenalis* en 6,5% de los gatos en Bogotá y la

presencia de los ensamblajes C y D en el 14,3% de perros de Ibagué (Santín y col., 2006; Rodríguez y col., 2014).

Finalmente, destacan tres publicaciones relativas a la calidad del agua en diversas zonas de Colombia. El primer estudio fue realizado en 5 estaciones de muestreo y dos plantas potabilizadoras de la cuenca alta del río Bogotá, con la presencia de altas concentraciones de *Cryptosporidium* en dos estaciones (266,3 y 233,3 ooquistes/litro, respectivamente) y de *Cryptosporidium* y *Giardia* en una de las potabilizadoras (13,3 ooquistes/litro y 10 quistes/litro, respectivamente) (Alarcón y col., 2005). Por su parte, Rodríguez y col. (2012) identificaron *C. parvum* en más de la mitad de las muestras fuentes de aguas y de aguas residuales en explotaciones bovinas de Antioquía, en concentraciones que oscilaron entre 1 y 3 x 10<sup>9</sup> ooquistes/100 ml. En un reciente trabajo se investigó la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* de la región de Quindío, donde se identificaron estos la presencia de *C. parvum* en el 21% de las muestras, *C. hominis* (10,5%), *G. duodenalis* ensamblaje A (5,2%) y *G. duodenalis* ensamblaje B (13,1%) (Triviño-Valencia y col., 2016).





**OBJETIVO 1. INVESTIGAR LA  
PRESENCIA Y DIVERSIDAD  
GENÉTICA DE LOS AISLADOS DE  
*Cryptosporidium* EN GANADO  
VACUNO, GANADO PORCINO Y  
POBLACIÓN HUMANA DE  
DIFERENTES REGIONES DE  
COLOMBIA**

---



# **1 MATERIAL Y MÉTODOS**

---

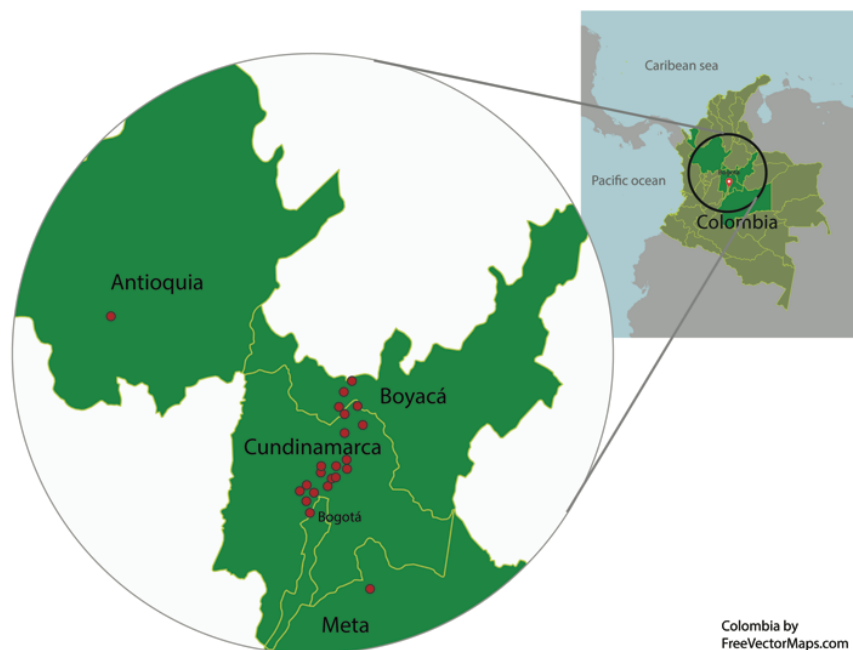


## 1.1 OBTENCIÓN Y ORIGEN DE LAS MUESTRAS FECALES

### 1.1.1 Ganado vacuno

La toma de muestras en ganado vacuno fue realizada entre junio de 2010 y noviembre de 2012 en un total de 74 explotaciones distribuidas en 22 municipios de tres Departamentos ubicados en la zona central de Colombia: Cundinamarca, Boyacá y Antioquia (Figura 17). En conjunto se tomaron muestras de heces de 432 terneros (*Bos taurus*) menores de 35 días, algunos de los cuales padecían diarrea (n: 90) pero otros no mostraron ningún síntoma de enfermedad (n: 342). Las muestras fueron obtenidas directamente del recto de los animales y posteriormente transportadas hasta el laboratorio en contenedores de poliespán refrigerados. El número de explotaciones analizadas en cada Departamento y número de muestras obtenidas por explotación fue variable (min 1, max: 37, media por explotación: 4), circunstancia limitado por la disponibilidad de los ganaderos y el número de terneros presente en el momento de realizar la visita (Tabla 13).

**Figura 17** Mapa de Colombia que muestra la distribución de las explotaciones bovinas muestreadas



**Tabla 13 Número de terneros analizados y explotaciones de origen en diferentes Departamentos de Colombia**

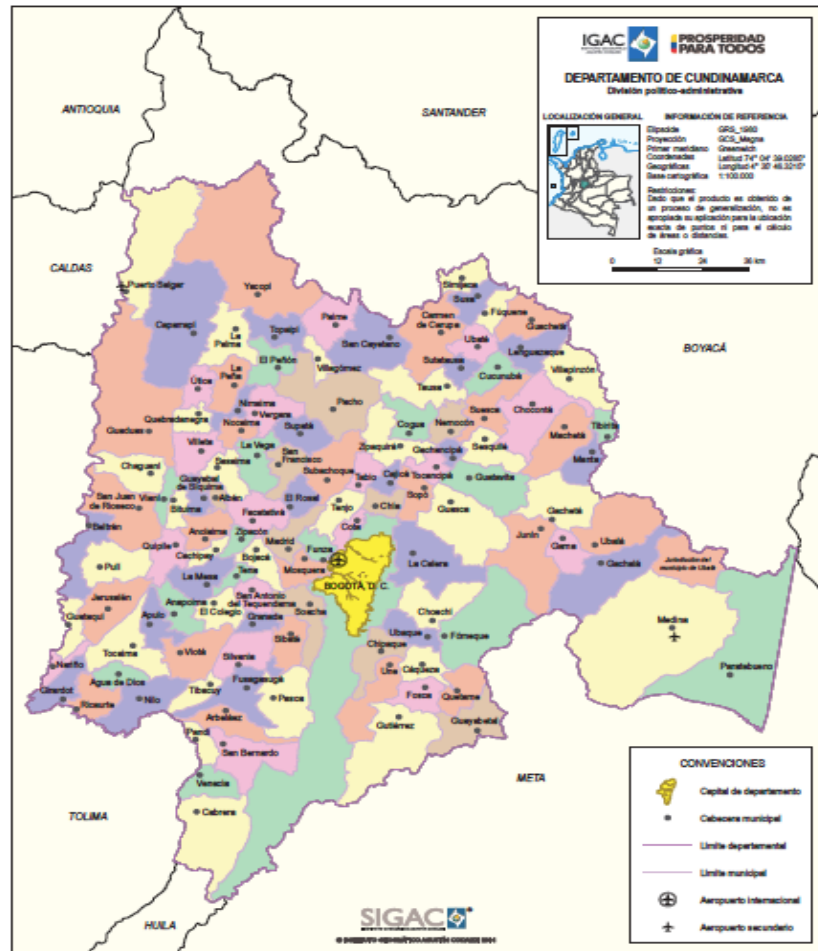
	Departamentos			Total
	Cundinamarca	Boyacá	Antioquia	
Terneros	286 (66.2%)	125 (29%)	21 (4.8%)	<b>432</b>
Explotaciones	51 (68.9%)	21 (28.4%)	2 (2.7%)	<b>74</b>

Los tres Departamentos donde se realizó el estudio se caracterizan por su variedad geográfica y climática. El Departamento de Cundinamarca se encuentra localizado en el área central de Colombia, sobre la cordillera Oriental y formando parte de la región Andina, extendiéndose desde la margen oriental del río Magdalena hasta el piedemonte Llanero (Figura 18). Comprende todos los pisos bioclimáticos, con un relieve variado de planicies, montañas y colinas y alturas que van desde los 300 a los 3.500 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Gobernación de Cundinamarca. Secretaria de Salud, 2013). Este Departamento lo integran 116 municipios distribuidos en 15 provincias, junto con el Distrito Capital Bogotá (Gobernación de Cundinamarca, 2015). Su extensión alcanza 24.210 km<sup>2</sup>, incluidos los 1.605 km<sup>2</sup> del Distrito Capital. De acuerdo al censo realizado por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), la población en el año 2005 ascendía a 2.228.682 habitantes, excluyendo los habitantes de Bogotá D.C donde el censo indicó una población de 6.778.691 personas (Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE, 2010b, 2010d).

El Departamento de Boyacá está ubicado en el centro oriente del país, atravesado por la Cordillera Oriental de la Región Andina Colombiana, por lo que tiene una topografía muy variada y diversidad de climas. Su superficie alcanza 23.189 km<sup>2</sup> y se encuentra dividido en 717 municipios, distribuidos en 12 provincias (Bernal, 2015; Gobernación de Boyacá, 2015) (Figura 19). Su población en el año 2005 ascendía a 1.210.982 habitantes (Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE, 2010c). El Departamento de Antioquia está ubicado al noroeste de Colombia, con una extensión de 63.612 km<sup>2</sup>; siendo el sexto más extenso de Colombia, con un total de 125 municipios distribuidos en 9 subregiones (Gobernación de Antioquia, 2016)

(Figura 20). Su población para 2005 era de 5.601.507 personas (Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE, 2010a).

**Figura 18 Mapa de Cundinamarca. División político – administrativa**



Tomado de: Instituto Geográfico Agustín Codazzi (2014c).

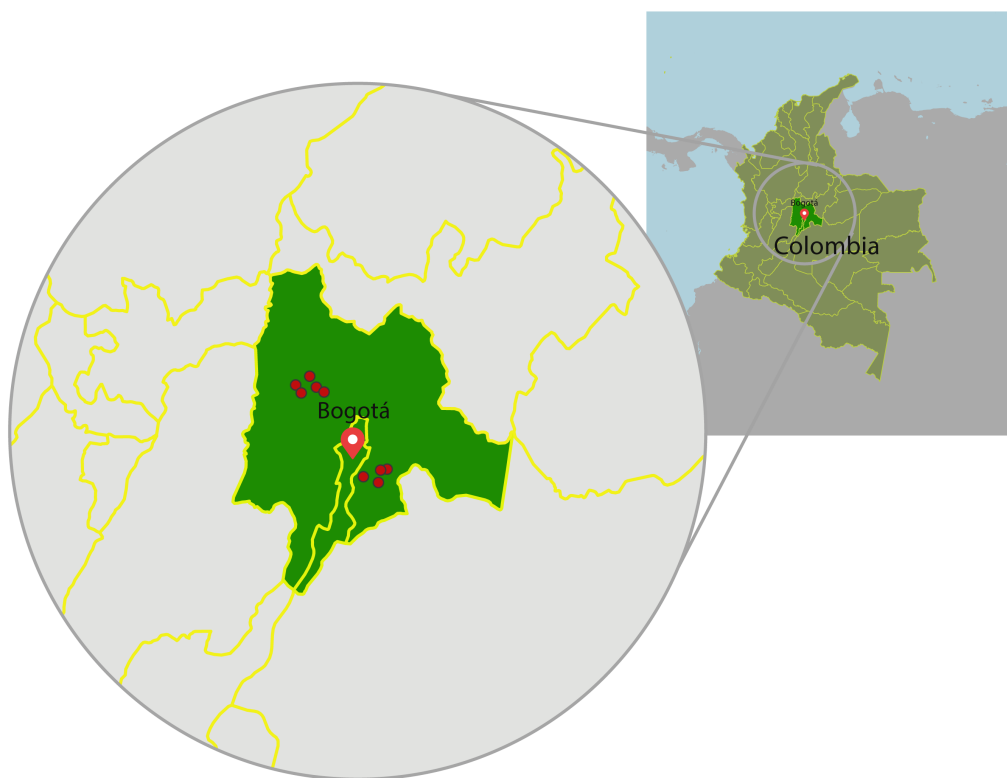




### 1.1.2 Ganado porcino

Durante el primer semestre de 2009 se recolectaron muestras de materia fecal en 19 explotaciones porcinas, ubicadas en 9 municipios de las regiones Gualivá y Oriente del Departamento de Cundinamarca (Figura 21). En total se recogieron muestras de 233 cerdos de las diferentes etapas de producción, que en Colombia se corresponden con las fases de lactancia (0-20 días de edad), precebo (21-63 días), levante (63-100 días), ceba (5-7 meses) y reproductores (>105 días) (Tabla 14). Las muestras fueron obtenidas directamente del recto de los animales, utilizando bolsas de plástico y fueron remitidas en refrigeración al laboratorio para su análisis.

**Figura 21** Mapa de Colombia que muestra la distribución de las explotaciones porcinas muestreadas



Colombia by  
FreeVectorMaps.com

**Tabla 14 Número de cerdos analizados y explotaciones de origen en diferentes Departamentos de Colombia. Clasificación por etapas productivas**

Etapas de cría	Gualivá		Oriente	
	No. animales (%)	No. explotaciones (%)	No. animales (%)	No. explotaciones (%)
Lactancia	27 (15,7)	7 (58,3)	7 (11,4)	4 (57,1)
Precebo	52 (30,1)	11 (91,7)	15 (24,6)	5 (71,4)
Levante	24 (14)	6 (50)	12 (19,7)	3 (42,9)
Ceba	13 (7,6)	4 (33,3)	9 (14,8)	3 (42,9)
Reproductores	56 (32,6)	11 (91,7)	18 (29,5)	5 (71,4)
<b>Total</b>	<b>172</b>	<b>12</b>	<b>61</b>	<b>7</b>

### 1.1.3 Humanos

Las muestras de origen humano se recolectaron en Bogotá D.C. y en los Departamentos de Valle del Cauca y Nariño. El Valle del Cauca es una de las regiones más ricas y de mayor desarrollo de la República de Colombia (Figura 22). Está ubicado en el suroccidente del país, tiene una superficie de 21.195 km<sup>2</sup> y cuenta administrativamente con 42 municipios, siendo su capital Santiago de Cali (Alcaldía de Santiago de Cali., 2004). El censo en el año 2005 indicaba una población de 4.052.535 habitantes (Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE, 2010e). El Departamento de Nariño está situado en el extremo suroeste del país, en la frontera con Ecuador. Su superficie es de 33.268 km<sup>2</sup> y está dividido en 63 municipios (Gobernación de Nariño, 2012) (Figura 23). Su población en el año 2005 era de 1.498.234 de personas (DANE., 2010d).

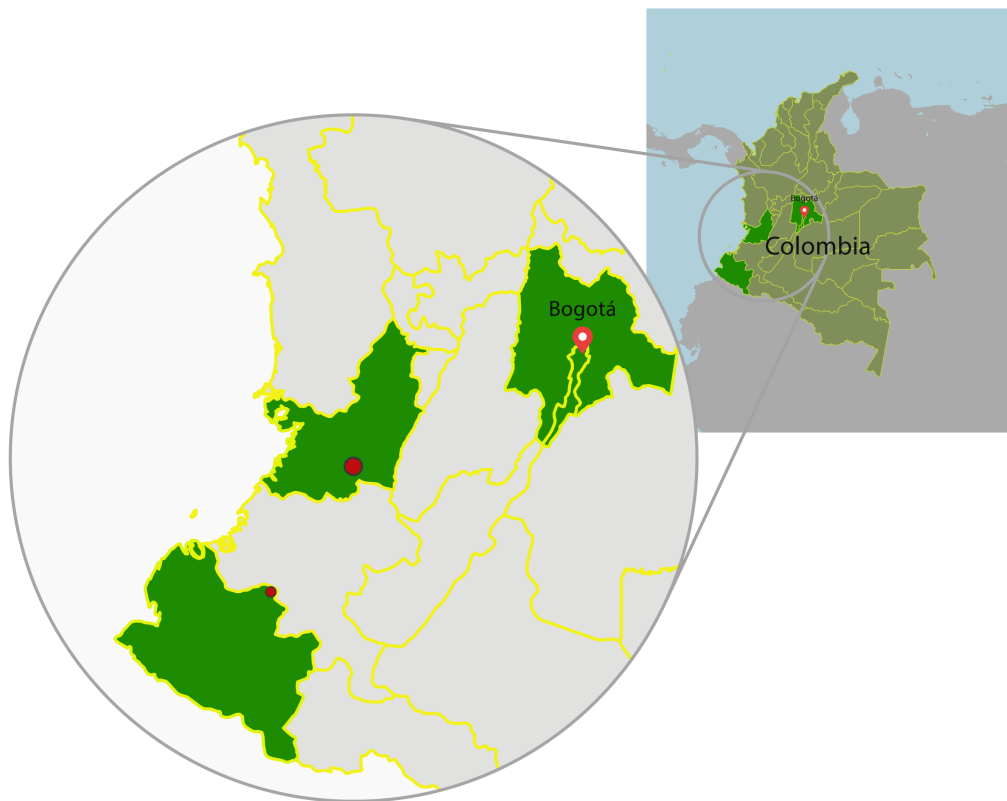


El estudio epidemiológico en población humana se realizó entre 2013 y 2014, periodo en el que se recolectaron muestras fecales de 663 individuos con edades comprendidas entre los 0 y los 19 años. Más de la mitad de las muestras fueron obtenidas durante el primer año (n: 356) y procedían en su totalidad de pacientes de un hospital de la ciudad de Bogotá, mientras que las obtenidas en el segundo año (n: 307) procedían de hospitales y colegios localizados tanto en Bogotá, D.C., como en el Valle del Cauca y Nariño (Tabla 15 y Figura 24).

**Tabla 15 Procedencia de las muestras fecales de origen humano utilizadas en el estudio epidemiológico**

Región	Colegio	Hospital	Total
Bogotá	47	468	515 (77,7%)
Nariño	108	0	108 (16,3%)
Valle del Cauca	14	26	40 (6%)
<b>Total</b>	<b>169 (25,5%)</b>	<b>494 (74,5%)</b>	<b>663 (100%)</b>

**Figura 24 Mapa de Colombia: zonas de procedencia de las muestras humanas**



Colombia by  
FreeVectorMaps.com

## 1.2 IDENTIFICACIÓN DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium*

La detección de ooquistes en las muestras de terneros fue realizada mediante frotis fecales sin concentrar teñidos con la tinción negativa de carbol fuscina (Heine, 1982). La intensidad de la infección fue estimada en base al promedio de ooquistes por campo microscópico (400×), según el baremo establecido por Chalmers (2012):

a) Negativo	ausencia de ooquistes
b) Leve	0 – 6 ooquistes / c.
c) Moderada	6 – 10 ooquistes / c.
d) Intensa	> 10 ooquistes / c.

Las muestras positivas de terneros fueron seleccionadas para su estudio molecular. Para ello, los ooquistes se concentraron con una solución salina saturada según el protocolo descrito por Elwin y col. (2001) y las suspensiones ooquisticas así obtenidas fueron conservadas a 4°C.

Para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* en las muestras fecales de origen porcino y humano se utilizó una técnica de concentración y tinción diferencial, teniendo en cuenta que en ambos hospedadores se suele registrar una excreción ooquistica muy inferior a la que se observa en terneros. Cada muestra fue procesada inicialmente mediante una técnica de sedimentación con agua – acetato de etilo (McNabb y col., 1985) y a partir del sedimento obtenido se realizó un frotis y tinción con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen y Pohlenz, 1981). Adicionalmente, y con el fin de identificar la presencia de otros parásitos gastrointestinales, una alícuota del sedimento obtenido fue examinada entre portaobjetos y cubreobjetos al microscopio óptico.

Las muestras de origen humano y porcino positivas a *Cryptosporidium* también fueron seleccionadas para realizar su estudio molecular, aunque en este caso, la extracción de ADN se llevó a cabo directamente sobre los concentrados obtenidos de la técnica de sedimentación. El estudio molecular también se realizó sobre las muestras de origen humano positivas a *Giardia*.

### 1.3 ESTUDIO MOLECULAR

#### 1.3.1 Extracción de ADN

En las muestras positivas a *Cryptosporidium*, una alícuota (200 µl) de la suspensión ooquistica obtenida tras la concentración por flotación (heces de terneros) o sedimentación (heces de origen humano y porcino) fue utilizada para extraer el ADN total. Para ello, cada alícuota se sometió a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido (1 minuto) y descongelación a 100°C (5 minutos), con el fin de romper la pared de los ooquistes. Posteriormente, las alícuotas se incubaron a 56°C en tampón de lisis con proteinasa K durante 30 minutos y se purificaron mediante columnas comerciales según las instrucciones del fabricante (QIAmp DNA minikit; Qiagen). Este mismo procedimiento fue utilizado para extraer el ADN total en las muestras de origen humano positivas a *Giardia*.

#### 1.3.2 Identificación de especies de *Cryptosporidium*

Se utilizó una técnica de PCR-RFLP que amplifica un fragmento del gen ssu-rRNA mediante PCR anidada y posterior análisis de restricción con las enzimas *Vspl*, *Sspl* y *MbolI* (Feng y col., 2007; Xiao y col., 2001). En el primer paso de la PCR se obtiene un producto de 1325 pares de bases (pb) que se amplifica con los cebadores Ssu1 y Ssu2, utilizando una mezcla de reacción constituida por tampón de reacción (1×), MgCl<sub>2</sub> (6 mM), cebadores (0,2 µM), dNTPs (200 µM), Taq DNA polimerasa (2,5U) (Eco-Taq; Ecogen, Barcelona) y 5 µl de ADN en un volumen final de 50 µl. Para ello se realizaron 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C (45 s), hibridación a 55°C (45 s) y extensión a 72°C (1 min), incluyendo una desnaturalización inicial a 94°C (3 min) y extensión final a 72°C (7 min).

Con el producto obtenido se realizó una segunda reacción de PCR utilizando los cebadores Ssu3 y Ssu4, con la que según la especie se obtiene un amplicón de 826-864pb. La mezcla de reacción y condiciones utilizadas en la PCR secundaria fueron idénticas a las anteriormente señaladas, excepto por la concentración de MgCl<sub>2</sub> (3 mM) y la adición de 5 µl del producto de la PCR primaria en sustitución del ADN original (Tabla 16).

Los productos amplificados en la segunda reacción de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (1,5%), confirmando la presencia del amplicón mediante tinción con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA). En las muestras donde se obtuvo un amplicón del tamaño esperado se realizó un análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) con las endonucleasas *Sspl*, *Vspl* y *MbolI* (Fermentas Life Sciences, Canadá) (Xiao y col., 2001; Feng y col., 2007). Para ello, se realizó la digestión de 2-10 µl (en función de la intensidad del amplicón) del producto obtenido en la PCR secundaria con una mezcla constituida por 10 U. de la enzima correspondiente y 2 µl del tampón en un volumen final de 20 µl. Los productos de digestión se fraccionaron mediante electroforesis en geles de agarosa (2%) y se visualizaron por tinción con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA).

Un grupo de aislados fue remitido para su secuenciación con el fin de confirmar la especie de *Cryptosporidium*. En este grupo se incluyeron aislados representativos de los diferentes hospedadores de origen, incluyendo aquéllos que proporcionaron un patrón de bandas distinto de *C. parvum* y *C. hominis* con el análisis de restricción. Estas muestras fueron purificadas y secuenciadas en doble sentido en un equipo del Servicio de secuenciación y genómica de la Universidad de Zaragoza (3500XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Las secuencias directas y reversas fueron alineadas y editadas con el programa Bioedit versión 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y las secuencias consenso fueron comparadas con las depositadas en la base de datos NCBI utilizando la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

En los aislados de *Cryptosporidium* de origen humano cuya especie/s no pudo ser identificada con el protocolo anterior tras repetidos intentos, bien porque no amplificaron o porque el amplicón obtenido no tuvo la intensidad suficiente para poder ser correctamente secuenciado, se utilizó una técnica de PCR multiplexada en tiempo real (RT-PCR) con un equipo Viia7 y sondas TaqMan (Applied Biosystems). Esta técnica amplifica de manera simultánea fragmentos de los loci SSU rRNA y Lib13 y permite detectar infecciones mixtas por las especies más comunes de *Cryptosporidium* en humanos (Hadfield y col., 2011).

El protocolo incluye dos reacciones de PCR por cada aislado, una duplexada con cebadores propios del género (SSUrRNA) y específicos de especie (Lib13) para *C. parvum*, junto con una reacción simple con cebadores específicos de especie (Lib13)

para *C. hominis* (Tabla 16). La reacción duplexada amplifica un producto de ~300 pb, y de ~166 pb para *C. parvum*, mientras que la segunda amplifica un fragmento de ~169 pb para *C. hominis*. La mezcla de reacción (25 µl) contiene 12,5 µl de TaqMan environmental master mix 2.0 (Applied Biosystem) y los cebadores en una concentración de 900 nM (excepto Lib13RCh a 300 nM). Las sondas fueron adicionadas a una concentración de 100nM (18STM), 150nM (Lib13TMCp) y 100nM (Lib13TMCh). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C (10 min), seguido por 55 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Los datos fueron registrados durante cada fase de hibridación/extensión a 60°C, en los canales verde (FAM), amarillo (VIC) y naranja (ROX).

**Tabla 16 Cebadores utilizados en la identificación de especies de *Cryptosporidium***

Locus	Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Ref.
<b>ssu-rRNA<sup>1</sup></b>	Ssu1	TTCTAGAGCTAATACATGCG	Xiao y col. (2001).
	Ssu2	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA	
	Ssu3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	
	Ssu4	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	
<b>ssu-rRNA<sup>2</sup></b>	18SF	GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGG	
	18SR	CTGCTTTAAGCACTCTAATTTTCTCAAAG	
	18STM	FAM-TACGAGCTTTTAACTGCAACAA MGB-NFQ	
<b><i>C. parvum</i> Lib13<sup>2</sup></b>	Lib13F	TCCTTGAAATGAATATTTGTGACTCG	Hadfield y col. (2011).
	Lib13RCp	TTAATGTGGTAGTTGCGGTTGAAC	
	Lib13TMCp	VIC-TATCTCTTCGTAGCGGCGTA MGB-NFQ	
<b><i>C. hominis</i> Lib13<sup>2</sup></b>	Lib13F	TCCTTGAAATGAATATTTGTGACTCG	
	Lib13RCh	AAATGTGGTAGTTGCGGTTGAAA	
	Lib13TMCh	VIC-CTTACTTCGTGGCGGCGT MGB-NFQ	

<sup>1</sup> Cebadores utilizados para identificar las especies mediante secuenciación

<sup>2</sup> Cebadores utilizados para identificar las especies en aislados de origen humano mediante PCR a tiempo real



### 1.3.3 Identificación de subtipos de *C. parvum* y *C. hominis*

En los aislados de origen humano y bovino identificados como *C. parvum* o *C. hominis* se determinó el subtipo en base al polimorfismo del gen GP60. Para ello se utilizó una PCR anidada que amplifica un fragmento de dicho marcador (800-850pb) con los cebadores AL3531/AL3535 en la reacción de PCR primaria y AL3532/AL3534 en la secundaria, siguiendo un protocolo previamente descrito (Alves y col., 2003) (Tabla 17). En ambas reacciones se utilizó una mezcla con un volumen final de 50 µl constituida por tampón de reacción (1×), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), cebadores (0,2 µM); dNTPs (200 µM), Taq DNA polimerasa (5U) (Eco-Taq; Ecogen, Barcelona) y 1µl de ADN/producto de la PCR primaria. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron: 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C (45 s), hibridación a 52°C (45 s) y extensión a 72°C (1 min), incluyendo una desnaturalización inicial a 94°C (3 min) y extensión final a 72°C (10 min).

**Tabla 17 Cebadores utilizados en la identificación de subtipos de *Cryptosporidium***

Locus	Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Referencia
<b>GP60<sup>1</sup></b>	AL3531	ATAGTCTCCGCTGTATTC	Alves y col., 2003.
	AL3535	GGAAGGAACGATGTATCT	
	AL3532	TCCGCTGTATTCTCAGCC	
	AL3534	GCAGAGGAACCAGCATC	
<b>GP60<sup>2</sup></b>	PAR60F	CCAGCCGTTCCACTCAGA	Ramo y col., 2014.
	PAR60R	HEX-GGTACCTTCTCCGAACCACA	

<sup>1</sup> Cebadores utilizados para identificar los subtipos mediante secuenciación

<sup>2</sup> Cebadores utilizados para identificar los subtipos en aislados de origen humano mediante análisis de fragmentos

Los productos de la PCR secundaria se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5%), confirmando la presencia del amplicón por tinción con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA). Las muestras positivas fueron purificadas y secuenciadas en doble sentido en un equipo del Servicio de secuenciación y genómica de la Universidad de Zaragoza (3500XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Las secuencias directas y reversas fueron alineadas y editadas con el

programa Bioedit versión 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y las secuencias consenso comparadas con las depositadas en la base de datos NCBI utilizando la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La denominación de subtipos se realizó en base al número de repeticiones de los trinucleótidos TCA y TCG en la región microsatélite, número de copias de la secuencia ACATCA situada inmediatamente después de dicha región para los subtipos pertenecientes a la familia Ila y por la presencia de otros polimorfismos fuera de dicha región (Sulaiman y col., 2005).

Con el fin de confirmar las distancias genéticas entre los subtipos GP60 identificados en los aislados de *Cryptosporidium* de los diferentes hospedadores se construyeron árboles filogenéticos con la aplicación TreeCon (<http://www.psb.rug.ac.Be/bioinformatics/psb/Userman/treeconw.html>), empleando el modelo de sustituciones de nucleótidos de dos parámetros de Kimura. Las secuencias representativas de las distintas especies y subtipos de *Cryptosporidium* identificadas en este trabajo han sido depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso MF142032 a MF142044 y MG924430 a MG924462.

En los aislados de *C. parvum* / *C. hominis* de origen humano cuyo subtipo no pudo ser identificado con el protocolo anterior tras repetidos intentos, bien porque no amplificaron o porque el amplicón obtenido no tuvo la intensidad suficiente para poder ser correctamente secuenciado, se utilizó una técnica de PCR que amplifica un fragmento más reducido del gen GP60 y cuyo amplicón fue identificado mediante análisis de fragmentos, utilizando para ello el cebador reverso marcado por el fluorocromo HEX (4,7,2',4',5',7'-hexafluoro-6-carboxifluoresceína) (Tabla 17). (Ramo y col., 2014). En este caso, la mezcla de reacción (20 µl) estaba constituida por 2 µl de ADN, tampón de reacción (1×), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de cada deoxinucleosido trifosfato (dNTP), 1 µM de cada cebador y 1 U de Taq polimerasa (Bioron, Alemania). Cada reacción fue sometida a 40 ciclos con una desnaturalización a 94°C (30 s), hibridación a 62°C (30 s) y extensión a 72°C (1 min), con una desnaturalización inicial a 94°C (5 min) y extensión final a 72°C (7 min). Para identificar el tamaño de los fragmentos obtenidos, el producto de esta reacción fue incluido en la mezcla utilizada para identificar los alelos de diversos microsatélites y minisatélites que se describe en el apartado siguiente (Tabla 18).

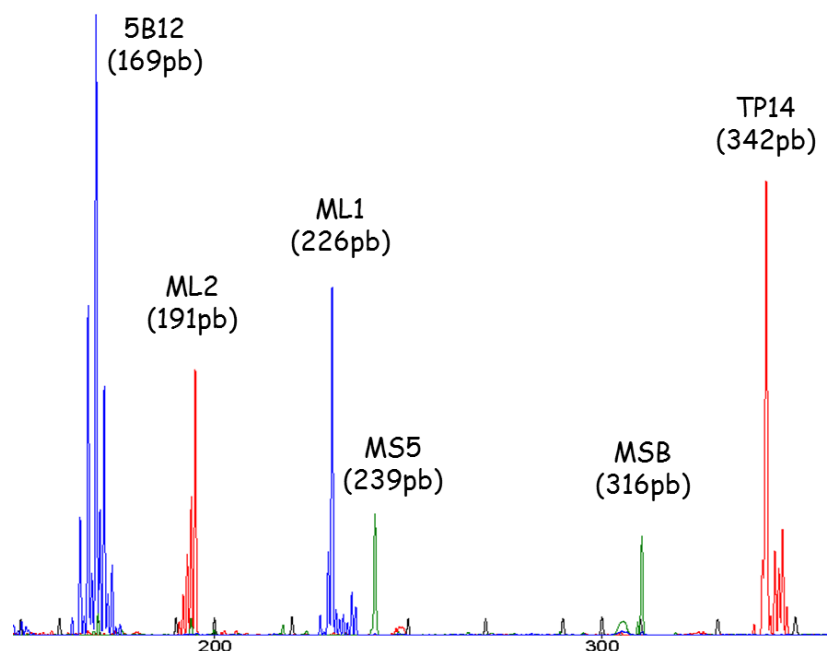
#### 1.3.4 Estudio multilocus con diversos minisatélites y microsatélites

Para investigar la variabilidad intra-específica de los aislados de *C. parvum* y/o *C. hominis* se realizó un estudio multilocus con diversos microsatélites y minisatélites, utilizando para ello una técnica de análisis de fragmentos. Esta técnica permite determinar el polimorfismo de todos los marcadores en una misma reacción, por lo que supone una notable reducción del coste económico en comparación como otros métodos como la secuenciación y un análisis mucho más rápido para identificar los alelos de los distintos loci.

En cada aislado se investigó el polimorfismo de nueve marcadores, incluyendo cinco microsatélites (ML1, ML2, TP14, 5B12, CP47) y cuatro minisatélites (MSB, MSC6-7, cgd2\_3850, cgd6\_5400). Para su amplificación se utilizaron cebadores y protocolos previamente descritos con reacciones de PCR simple (MSB, ML2, 5B12), semianidada (ML1, cgd6\_5400) y anidada (TP14, CP47, MSC6-7 y cgd2\_3850). En función del tamaño esperado del amplicón y con el fin de evitar solapamiento de los picos en el electroferograma, el cebador reverso utilizado en las reacciones de PCR simple y el reverso interno usado en pruebas semianidadas o anidadas fueron marcados en el extremo 5' con uno de estos tres fluorocromos: HEX (4,7,2',4',5',7'-hexafluoro-6-carboxifluoresceína), FAM (6-carboxifluoresceína) o TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) (Figura 25).

En la Tabla 18 se indican los cebadores utilizados en las diferentes reacciones, así como las temperaturas de hibridación y el tamaño esperado de los productos de PCR. Para la amplificación de todos los marcadores se utilizaron condiciones similares, exceptuando los loci CP47 y MSC6-7. Concretamente, la mezcla de reacción en las reacciones de PCR simple consistió de tampón de reacción (1×), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (200 μM), cebadores (1 μM), Taq DNA polimerasa (1 U) (Eco-Taq; Ecogen, Barcelona) y 2 μl de ADN, todo ello en un volumen final de 20 μl. Las reacciones se llevaron a cabo con 40 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C (30 s), hibridación a temperatura variable según el marcador (30 s) y extensión 72°C (1 min), utilizando una desnaturalización inicial a 94°C (5 min) y extensión final a 72°C (7 min).

**Figura 25** Análisis de fragmentos de diversos microsátélites y minisatélites. Electroferograma donde se observa la asignación de alelos en función del fluorocromo utilizado en cada marcador y el tamaño de amplicón



La mezcla de reacción en las reacciones semianidadas o anidadas también se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  y estaba constituida por tampón de reacción (1 $\times$ ),  $\text{MgCl}_2$  (2,5 mM), dNTPs (200  $\mu\text{M}$ ), cebadores (0,5  $\mu\text{M}$ ), Taq DNA polimerasa (1 U) (Eco-Taq; Ecogen, Barcelona) y 2  $\mu\text{l}$  de ADN o del producto de la reacción primaria. Para llevar a cabo la amplificación en este caso se realizaron 35 ciclos con una desnaturalización a 95°C (50 s), hibridación a temperatura variable según el marcador (50 s) y extensión 72°C (1 min), junto una desnaturalización inicial a 95°C (3 min) y extensión final a 72°C (10 min).

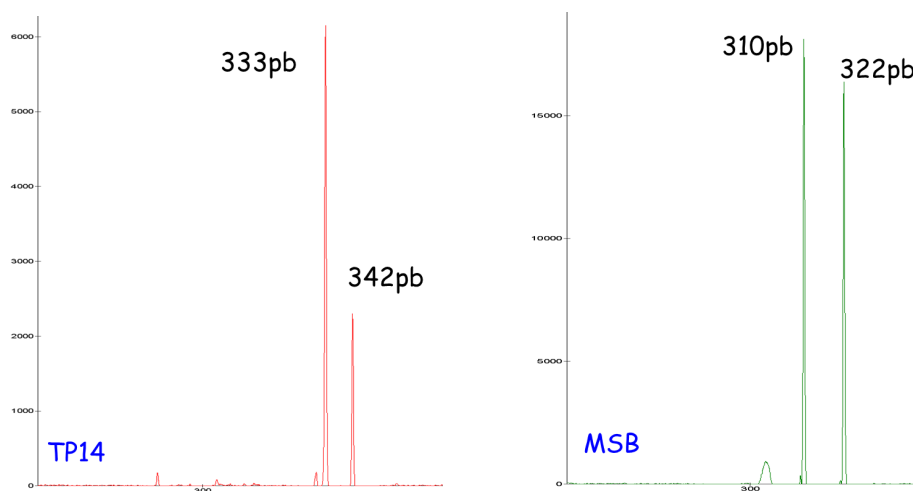
Los marcadores CP47 y MSC6-7 fueron amplificados mediante una reacción de PCR anidada siguiendo el protocolo descrito por Gatei y col. (2007). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  y estaban constituidas por una mezcla con tampón de reacción (1 $\times$ ), 1  $\mu\text{l}$  de ADN o 2  $\mu\text{l}$  del producto de la reacción primaria,  $\text{MgCl}_2$  (3 mM), una concentración 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, una concentración 0,25  $\mu\text{M}$  (reacción primaria) o 0,5  $\mu\text{M}$  (reacción secundaria) de cada cebador y 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Eco-Taq; Ecogen, Barcelona). Las reacciones se llevaron a cabo con 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94°C (45 s),

hibridación a temperatura variable según el marcador (45 s) y extensión 72°C (1 min), utilizando una desnaturalización inicial a 94°C (5 min) y extensión final a 72°C (10 min).

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y visualizados con el transiluminador por tinción con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA) para confirmar la presencia de un amplicón del tamaño esperado. Para cada muestra se realizó una mezcla en un tubo, adicionando entre 0.5 y 2 µl del producto final de la PCR de cada marcador, según la intensidad de la banda. La mezcla fue sometida a electroforesis capilar en un equipo del Servicio de Secuenciación y Genómica de la Universidad de Zaragoza (3500xL Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Los datos obtenidos fueron analizados con el software Gene Mapper (versión 4.1) para identificar el tamaño de los fragmentos.

El electroferograma obtenido con esta técnica para cada aislado contiene diversos picos de fluorescencia, cada uno de los cuales es asignado a un marcador en función del fluorocromo y el tamaño esperado del amplicón. La posición de cada pico sobre el eje axial indica el tamaño del fragmento en pares de bases (Figura 25). La presencia de dos picos separados por múltiplos de la unidad repetitiva fue interpretado como una infección mixta (Quílez y col., 2014) (Figura 26).

**Figura 26 Análisis de fragmentos. Electroferogramas indicativos de infecciones mixtas por dos alelos en los loci TP14 y MSB, respectivamente**



Con el fin de confirmar el tamaño de los fragmentos, al menos dos aislados representativos para cada uno de los alelos identificados fueron amplificados con cebadores no marcados y remitidos para su secuenciación bidireccional al Servicio de secuenciación y genómica de la Universidad de Zaragoza. En todos los marcadores se observó discrepancia entre el tamaño proporcionado por electroforesis capilar y el obtenido mediante secuenciación, siendo esta última técnica la que permite determinar el tamaño real al contar los pares de bases del fragmento. Dicha discrepancia oscilaba entre 1 y 7 pb según el marcador. Tras realizar el ajuste correspondiente en base a dichas discrepancias, cada alelo fue denominado en base a su tamaño (pb). Las secuencias representativas de los distintos alelos identificados en este trabajo han sido depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso MG924432 a MG924435, MG924439 a MG924446.

El subtipo multilocus (MLT) de cada aislado se determinó en base a la combinación de alelos en los diferentes marcadores investigados, incluyendo el subtipo GP60 y a cada uno se les asignó una codificación numérica. Únicamente se incluyeron en el análisis multilocus aquellos aislados que amplificaron en la totalidad de loci. Los aislados con infección mixta por dos alelos en un solo locus fueron desglosados y asignados al correspondiente MLT. El poder discriminatorio de cada marcador individual y de la técnica multilocus fue determinado mediante el índice de Hunter-Gaston (HGDI) (Hunter y Gaston, 1988). Para su cálculo se utilizó la herramienta V-DICE di ("Variable Number Tandem Repeat Diversity and Confidence Extractor") disponible en <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>.

La relación entre los diferentes MLTs fue investigada mediante el algoritmo eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) utilizando la configuración más rigurosa, por la cual sólo se incluyen en el mismo complejo clonal aquellos MLTs que difieren en un único locus ("single locus variants" = SLVs). Cada complejo se forma en torno a un miembro fundador que tiene el mayor número de SLVs y se considera el tipo ancestral (Feil y col., 2004). Asimismo, se determinó el índice de asociación estandarizado ( $I_A^S$ ) como medida para determinar el desequilibrio de ligamiento (LD) entre los diferentes MLTs, utilizando la aplicación LIAN v. 3.7 (<http://guanine.evolbio.mpg.de/cgi-bin/lian/lian.cgi.pl>) (Haubold y Hudson, 2000).

La estructura de poblaciones fue investigada con el software Structure v. 2.3 (<http://pritchardlab.stanford.edu/structure.html>) que utiliza un algoritmo de tipo bayesiano para identificar subpoblaciones con ancestros genéticos diferentes en base a la frecuencia de alelos (Pritchard y col., 2000). El número más probable de poblaciones ancestrales fue definida por el valor de  $K$  según se ha descrito previamente (Evanno y col., 2005).

**Tabla 18 Cebadores y condiciones utilizadas en las reacciones de PCR para la amplificación de diversos microsatlélites y minisatlélites**

Locus	Nº acceso GenBank	Crom*	SECUENCIA CEBADOR (5' → 3')	Secuencia repetitiva	Tª hibridación (°C)	Tamaño amplicón (bp)	Referencia
ML2	AF344880	VI	F: CAATGTAAGTTTACTTATGATTAT R: FAM-CGACTATAAAGATGAGAGAAG	AG	50	180-237	Cacciò y col., 2001.
5B12	AQ449854	II	F: TGACGATGAAGATGAGGGAAC R: HEX-CAGGACAGATTTAGGAGGAGGA	AT	60	134-155	Quílez y col., 2011.
MSB	XM627997	I	F: GGGAGGCATAGGGATGA R: TAMRA-CTTTTGATCGCTTCTTTTCCA	AGATAG	59	246-324	Tanriverdi y Widmer, 2006.
TP14	XM627041	VIII	F1: TAATGCCCAACCCATCTTCTT R1: TCCATCTGGTCCCATTTAGC F2: CTAACGTTTACAGCCCAACAGTACC R2: FAM-GTACAGCTCCTGTTCTGTTG	CAA	61 62	279-333	Mallon y col., 2003; Quílez y col., 2011.
ML1	G35348	III	F1: CATGAGCTAAAAATGGTGG F2: CTAATAATGGTGGAGAATATTC R: HEX-CAACAAAAATCTATATCCTC	GAG	55 50	218-242	Cacciò y col., 2000; Chalmers y col., 2005.
CP47	AF384127	VI	F1: GCTTAGATTCTGATATGGATCTAT R1: AGCTTACTGGTCCTGTATCAGTT F2: ACCCCAGAAAGGCGGACCAAGGTT R2: FAM-GTATCGTGCGTCTTCTGAATTATCAA	TAA, TGATAG	43 55	417-479	Gatei y col., 2007.



Locus	Nº acceso GenBank	Crom*	SECUENCIA CEBADOR (5' → 3')	Secuencia repetitiva	Tª hibridación (°C)	Tamaño amplicón (bp)	Referencia
MSC6-7	BX538350	VI	F1: ATTGAACAAACGCCGCAAATGTACA	TGATGATG AT(G)GAAC C(T)	55	517-570	Gatei y col., 2007.
			R1: CGATTATCTCAATATTGGCTGTTATT				
			GC				
			F2: GCTATTTGCTATCGTCTCACATAACT				
cgd2_3850	XM626569	II	R2: TAMRA- CTACTGAATCTGATCTTGCATCAAGT	CTGCTC(A)	70	151-205	Ramo y col., 2017.
			F1: ATTGAAGATTGCCGGATGATGGGGTT				
			R1: TGGAGCGCCAAGTGCTGAAGA				
			F2: ATTTGCTGTTGCAACTGGTG				
cgd6_5400	XM627858	VI	R2: TAMRA- GCCAAGTGCTGAAGAAGAGG	GTAGTG(A)	60	251-312	Ramo y col., 2017.
			F: TAA TC TTT GCG TGG GAC CTC				
			R1: GTGACTTGAATGACCCAGGA				
			R2: HEX- TGGAGTTTCTGAGACACAAAAGA				

\* Cromosoma

### 1.3.5 Estudio de la diversidad genética de los aislados de *Giardia*

La identificación de especies y ensamblajes de *Giardia* en las muestras positivas de origen humano fue determinada mediante la amplificación por PCR anidada y posterior secuenciación de los genes ssu-rRNA,  $\beta$ -giardina (*bg*) y triosa fosfato isomerasa (*tpi*), utilizando protocolos previamente descritos (Appelbee y col., 2003; Sulaiman y col., 2003; Lalle y col., 2005). Los cebadores y condiciones utilizados en las diferentes reacciones se indican en la Tabla 19. Los productos obtenidos en las PCRs secundarias se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, confirmando la presencia del amplicón por tinción con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA).

Las muestras positivas fueron purificadas y secuenciadas en doble sentido en un equipo del Servicio de secuenciación y genómica de la Universidad de Zaragoza (3500XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Las secuencias directas y reversas fueron alineadas y editadas con el programa Bioedit versión 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y las secuencias consenso fueron comparadas con las depositadas en la base de datos NCBI utilizando la herramienta BLAST.

Para la identificación de ensamblajes y subensamblajes se utilizaron distintas secuencias de referencia depositadas en GenBank. Concretamente, en el caso de gen *bg* se emplearon las descritas por Cacciò y col. (2002) con números de acceso AY072723, AY072724, AY272725, AY072727, AY072729) y de Lucio y col. (2015) (KT310377). Para el gen *tpi* se utilizaron las depositadas por Monis y col. (1999) (AF069556, AF069557, AF069560, AF069561) y para el marcador ssu-rRNA las descritas por Wang y col. (2014) (KF843922) y Karim y col. (2015) (KJ888984).

Para el análisis filogenético se emplearon las secuencias de los marcadores *tpi* y *bg*, las cuales fueron comparadas con secuencias de referencia anteriormente mencionadas y alineadas en Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Li y col., 2015; McWilliam y col., 2013; Sievers y col., 2011). El árbol se construyó usando MEGA versión 6.06 (<http://www.megasoftware.net>) (Nei y Kumar, 2000; Tamura y col., 2013). En el caso de las secuencias *bg* se utilizó el modelo Tamura-Nei 93 (Felsenstein, 1985; Saitou y Nei, 1987; Tamura y Nei, 1993; Tamura y col., 2013), mientras que para las secuencias de *tpi* y en base al cálculo de las distancias

genéticas se utilizó el modelo de dos parámetros de Kimura (Felsenstein, 1985; Kimura, 1980; Saitou y Nei, 1987; Tamura y col., 2013).

#### **1.4 ESTUDIO ESTADÍSTICO**

La existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la infección por *Cryptosporidium* en terneros y diversas variables (edad, presencia de diarrea) fue evaluada mediante pruebas de Chi-cuadrado o test de Fisher. El análisis se realizó mediante el software R versión 3.1.3 R (R Development Core Team, 2013), considerando significativo un valor de  $P < 0.05$ . El análisis de riesgos se realizó con Win Episcopes 2.0, calculando el valor “Odds ratio” (OR) con un intervalo de confianza (CI) del 95% (Thrusfield y col., 2001). El riesgo de infección fue considerado significativo si el CI 95% no incluía el valor 1.0 (Fletcher y col., 1996).

**Tabla 19 Cebadores y condiciones utilizadas en las reacciones de PCR para la identificación de especies y ensamblajes de *Giardia***

Locus	Cebador	Secuencia 5'→ 3'	Condiciones de la PCR		Referencia
<b>ssu-rRNA</b>	F1 (Gia2029)	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	d.i.: 96°C, 2 min		
	R1 (Gia2150c)	CTGCTGCCCGTCCCTTGGATGT	35 ciclos: 96°C, 45s, 58°C (1°) / 55°C (2°), 30s, 72°C, 45s		Appelbee y col., 2003.
	F2 (RH11)	CATCCGGTCGATCCTGCC			
	R2 (RH4)	AGTCGAACCCCTGATTCTCCGCCCCAGG	e.f.: 72°C, 4 min		
<b>bg</b>	F1 (bg1)	AAGCCCGACGACCTCACCCGCGAGTGC	d.i.: 95°C, 15 min		
	R1 (bg2)	GAGCCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	35 ciclos: 95°C, 30s, 65°C (1°) / 55°C(2°), 30s, 72°C, 1 min		Lalle y col., 2005.
	F2 (bg3)	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG			
	R2 (bg4)	CTCGACGAGCTTCGTGTT	e.f.: 72°C, 10 min		
<b>tpi</b>	F1 (AL3543)	AAATATGCCCTGCTCGTCG	d.i.: 94°C, 5 min		
	R1 (AL3546)	CAAACCTTITCCGCAAACC	35 ciclos: 94°C, 45s, 50°C, 45s, 72°C, 1 min		Sulaiman y col., 2003.
	F2 (AL3544)	CCCTTCATCGGIGGTAACCTT			
	R2 (AL3545)	GTGGCCACCACICCCGTGCC	e.f.: 72°C, 7 min		

d.i.: desnaturalización inicial; e.f.: extensión final

## **2 RESULTADOS**

---



## 2.1 GANADO VACUNO

### 2.1.1 Estudio microscópico

El análisis microscópico de las muestras fecales de terneros mediante la tinción negativa permitió identificar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 115 de las 432 muestras analizadas (26,6%). Los animales infectados pertenecían a 44 de las 74 explotaciones muestreadas (59,5%), distribuidas por los tres Departamentos objeto de estudio (Tabla 20). Algunos terneros de tan sólo 3 días de edad ya eliminaban ooquistes en las heces, aunque el porcentaje de animales parasitados fue significativamente mayor en los de 8 – 14 días (40,7%) que en los grupos de edad restantes ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (Tabla 21). El riesgo de estar infectado está estrechamente asociado con la edad de los animales, de manera que los terneros menores de 21 días tenían entre 1,6 y 4,3 veces más posibilidades de estar infectados ( $90/273 = 33\%$ ) que los mayores de 21 días ( $25/159 = 15,7\%$ ) (OR: 2,64; 95% IC 95%: 1,62 – 4,28).

El estudio clínico y de la consistencia fecal en los terneros reveló la presencia de un síndrome diarreico en 90 animales (20,8%) de casi la mitad de las explotaciones ( $36/74 = 48,6\%$ ). En todos los grupos de edad se constató que el porcentaje de animales parasitados fue superior entre los afectados por diarrea que en aquéllos aparentemente asintomáticos, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en los menores de 14 días y en los mayores de 29 días ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (Tabla 21). Análogamente, la probabilidad de padecer diarrea fue significativamente mayor en los terneros infectados por *Cryptosporidium* ( $47/115 = 40,8\%$ ) que en los no parasitados ( $43/317 = 13,6\%$ ) ( $P < 0,001$ ,  $\chi^2$ ). De hecho, la probabilidad de padecer diarrea se incrementa entre 2,7 y 7 veces en el primer grupo en comparación con los terneros del segundo grupo (OR: 4,40; 95% IC 95%: 2,75 – 7,05).

El recuento semicuantitativo de ooquistes de *Cryptosporidium* en 110 de las muestras positivas reveló que la mayoría de terneros tenían una infección de intensidad calificada como leve (n: 61) o moderada (n: 22) y en 27 animales se constató una excreción ooquistica intensa (Tabla 22). Al analizar el conjunto de animales se comprobó que la intensidad de la excreción ooquistica estuvo relacionada estadísticamente con la presencia de diarrea, aunque esta circunstancia no se repitió en cada uno de los grupos de edad por separado ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ).

**Tabla 20 Número de terneros parasitados por *Cryptosporidium* en tres Departamentos de Colombia según el estudio microscópico de muestras fecales. Explotaciones y municipios de origen**

Departamento / Municipio	Infectados/Estudiados	
	Terneros	Explotaciones
<b>ANTIOQUIA</b>		
Envigado	3/22	1/2
<b>BOYACÁ</b>		
Chiquinquirá	11/75	4/11
Saboyá	0/8	0/3
San Miguel	2/42	2/7
<b>CUNDINAMARCA</b>		
Bogotá	7/14	2/2
Chía	6/18	4/5
Cogua	15/68	2/2
Cota	1/15	1/1
Gachancipá	2/7	2/4
Guachetá	5/5	2/2
Nemocón	3/3	1/1
Simijaca	2/24	1/3
Sopó	15/25	4/6
Suesca	11/11	3/3
Susa	8/47	3/11
Tabio	1/1	1/1
Tenjo	2/15	1/1
Tocancipá	8/19	3/3
Ubaté	13/13	6/6
<b>Total</b>	<b>115/432</b>	<b>44/74</b>



**Tabla 21 Prevalencia de *Cryptosporidium* en terneros lactantes de acuerdo con la edad y presencia de diarrea**

Grupo de edad	Infectados / Estudiados (%)			
	Diarrea	No diarrea	<i>P</i> *	Total terneros
≤ 7 días	6/11 (54,5%)	6/42 (14,3%)	0,0045	12/53 (22,6%)
8 – 14	23/28 (82,1%)	25/90 (27,8%)	<0,0001	48/118 (40,7%)
15 – 21	8/18 (44,4%)	22/84 (26,2%)	NS	30/102 (29,4%)
22 – 28	4/21 (19%)	9/83 (10,8%)	NS	13/104 (12,5%)
≥ 29	6/12 (50%)	6/43 (13,9%)	<0,0001	12/55 (21,8%)
<b>Total</b>	<b>47/90 (52,2%)</b>	<b>68/342 (19,9%)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>115/432 (26,6%)</b>

\* *P*: valor obtenido al comparar el porcentaje de parasitación entre terneros con y sin diarrea en cada grupo de edad.

Tabla 22 Intensidad de la infección por *Cryptosporidium* en terneros lactantes según la presencia de diarrea y la edad

Intensidad*	LEVE (0-6 ooc/c., 400x)		MODERADA (6-10 ooc/c., 400x)		INTENSA (>10 ooc/c., 400x)		Total terneros
	Diarrea	No diarrea	Diarrea	No diarrea	Diarrea	No diarrea	
≤ 7 días	2	3	1	2	3	1	12 (10,9%)
8 – 14	9	14	5	6	8	4	46 (41,8%)
15 – 21	1	14	2	3	5	5	30 (27,3%)
22 – 28	2	6	0	2	1	0	11 (10%)
≥ 29	6	4	0	1	0	0	11 (10%)
<b>Total*</b>	<b>20</b>	<b>41</b>	<b>8</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	<b>110</b>
	<b>61 (55,5%)</b>		<b>22 (20%)</b>		<b>27 (24,5%)</b>		

\*La intensidad de parasitación se determinó en un total de 110 terneros parasitados

### 2.1.2 Estudio molecular

El análisis molecular de las muestras de terneros positivas a *Cryptosporidium* mediante el locus ssu-rRNA proporcionó un amplicón del tamaño esperado en 73 aislados. Mediante el análisis de restricción se obtuvieron fragmentos indicativos de *C. parvum* en 71 de ellos, procedentes de 32 granjas y 16 municipios. Ocho de estos aislados fueron remitidos para su secuenciación y mostraron una homología del 100% con la secuencia de GenBank AF093490 obtenida de un ternero en Estados Unidos (Xiao y col., 1999). El patrón de restricción de los dos aislados restantes, obtenidos en sendas explotaciones, fue compatible con *C. bovis* y su secuenciación posterior confirmó esta circunstancia, al proporcionar una secuencia idéntica a *C. bovis* con número de acceso AY741305 (Fayer y col., 2006).

La amplificación del locus GP60 resultó positiva en los 71 aislados de *C. parvum*, que fueron clasificados en ocho subtipos de la familia IIa. El subtipo IIaA18G5R1 fue claramente el más prevalente, al ser identificado en más del 66% de los aislados y 68% de explotaciones en un total de 12 municipios. La distribución de los subtipos restantes fue mucho más restringida, siendo detectados en un menor número de explotaciones (1 – 5) y municipios (1 – 2) (Tabla 23).

**Tabla 23 Distribución de subtipos GP60 de *C. parvum* en terneros menores de 35 días en explotaciones lecheras de diferentes municipios de Colombia**

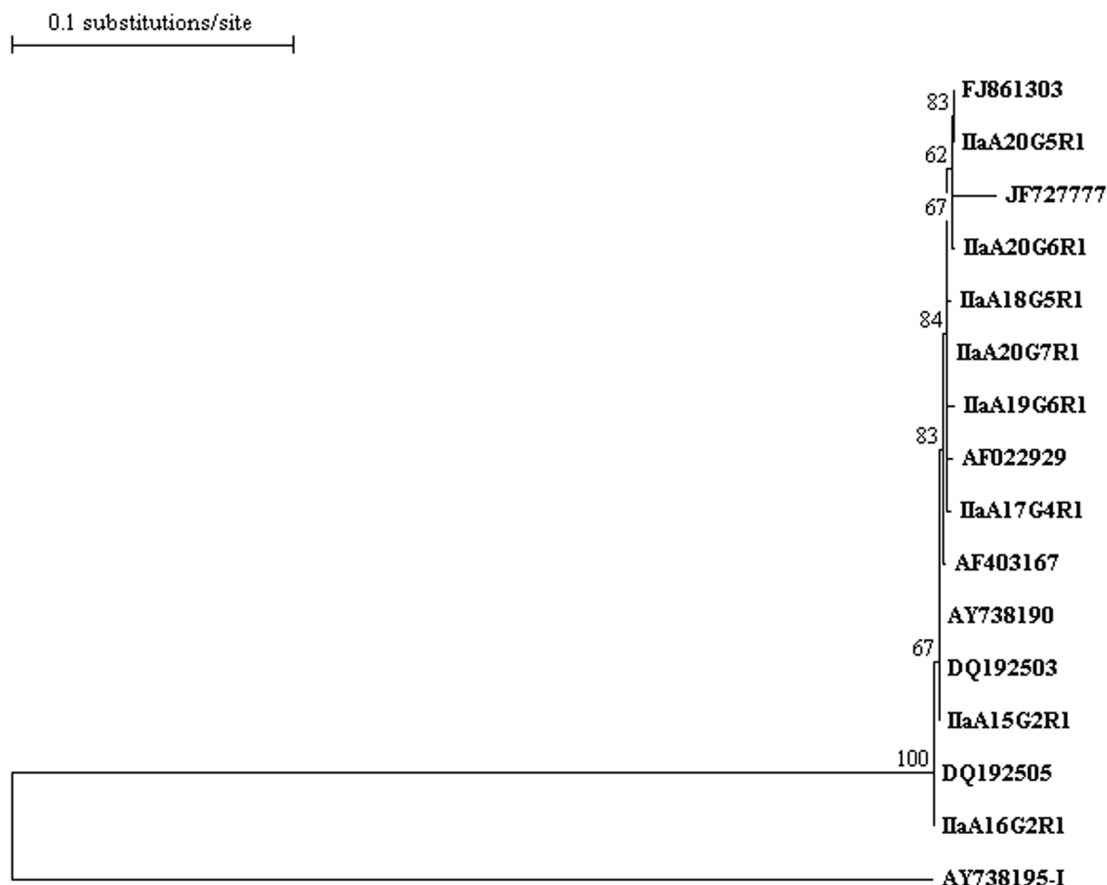
Subtipo	Nº muestras (%) (n: 71)	Nº explotaciones (%) (n: 31)	Nº municipios (%) (n: 16)
IIaA15G2R1	9 (12,7%)	5 (15,6%)	2 (12,5%)
IIaA16G2R1	3 (4,2%)	1 (3,1%)	1 (6,3%)
IIaA17G4R1	2 (2,8%)	1 (3,1%)	1 (6,3%)
IIaA18G5R1	47 (66,2%)	22 (68,7%)	12 (75%)
IIaA19G6R1	2 (2,8%)	2 (6,2%)	2 (12,5%)
IIaA20G5R1	3 (4,2%)	3 (9,3%)	2 (12,5%)
IIaA20G6R1	4 (5,6%)	1 (3,1%)	1 (6,3%)
IIaA20G7R1	1 (1,3%)	1 (3,1%)	1 (6,3%)

Entre estos subtipos minoritarios cabe destacar la variante IIaA15G2R1, considerada la más frecuente en terneros en la mayoría de países, que a pesar de ser la segunda más prevalente en nuestro estudio solamente fue observada en algo más del 12% de aislados y 15% de granjas. Tres variantes fueron clasificadas como

subtipos de nueva descripción (IIaA19G6R1, IIaA20G6R1 y IIaA20G7R1), ya que no coincidían en número de repeticiones de los triplete TCA y/o TCG con ninguna de las secuencias depositadas en GenBank.

En la mayoría de las granjas donde se analizaron muestras de al menos dos terneros (11/15) se observó que todos ellos estaban infectados por el mismo subtipo, mientras que las cuatro granjas restantes se confirmó la coexistencia de dos subtipos circulantes. Aunque algunas de los aislados procedían de terneros con diarrea (n: 28), no se pudo demostrar una asociación estadística entre un determinado subtipo y la consistencia de las heces. Análogamente, tampoco se encontró una relación significativa entre los diferentes subtipos y la edad de los terneros. El análisis filogenético mostró la similitud entre los aislados examinados en este trabajo y diferentes secuencias de referencia depositadas en GenBank e identificadas como alelos de la familia IIa (Figura 27). Las secuencias de nucleótidos de diferentes especies y subtipos de *Cryptosporidium* generadas en este estudio han sido depositadas en GenBank con los números de acceso MF142032, MF142033, MF142037 a MF142044.

**Figura 27 Análisis filogenético de los aislados identificados en el presente estudio y diferentes subtipos de *C. parvum* depositados en GenBank. Análisis del gen GP60 con base a las distancias genéticas calculadas mediante el modelo de dos parámetros de Kimura. En cada nodo se indican los valores bootstrap superiores al 50% para 1.000 repeticiones. Se ha incluido como grupo externo la secuencia de *C. parvum* subtipo licA5G3a con número de acceso AY738195**



La investigación del polimorfismo de nueve microsatélites y minisatélites mediante una técnica de análisis de fragmentos reveló que la diversidad genética de los aislados de *C. parvum* objeto de estudio era muy superior a la observada en base a la secuenciación del locus GP60. En la Tabla 24 se indican los alelos identificados y el índice discriminatorio de cada marcador. Un total de 70 aislados procedentes de 32 explotaciones fueron positivos a uno o varios de estos marcadores. En la mayoría de estos loci se identificaron dos (ML1, MSB, CP47, MSC6-7) o tres (5B12, Cgd2\_3850, Cgd6\_5400) alelos, pero el locus TP14 fue monomórfico, ya que todos los aislados expresaron el mismo alelo de 324 pb. La secuencia de este alelo fue idéntica a la observada por Abrahamsen y col. (2004) en la descripción del genoma de *C. parvum* y

depositada en GenBank con número de acceso XM627041. El locus ML2 fue el más variable, con un total de seis alelos con tamaños comprendidos entre 219 y 245 pb.

La mayoría de marcadores exhibían un alelo mayoritario, que fue expresado por más del 85% de los aislados de *C. parvum*, destacando tres marcadores donde más del 95% de las muestras presentaban el mismo alelo (ML1, MSB y MSC6/7). La distribución de alelos fue por el contrario más uniforme en los loci Cgd2\_3850 y ML2, circunstancia por la cual fueron los de mayor poder discriminatorio. Concretamente, el índice HGDI en ambos marcadores fue 0,459 y 0,822, respectivamente, mientras que el valor en los restantes micro- y minisatélites era inferior a 0,240. Cabe destacar que solamente el microsatélite ML2 proporcionó un poder discriminatorio superior al obtenido mediante secuenciación del locus GP60 (0,506) (Tabla 24).

La secuenciación de un grupo de aislados representativos de los diferentes alelos identificados reveló la presencia de algunos nuevos no descritos previamente en GenBank, concretamente en los marcadores ML2 (alelos de 219 y 245 pb), 5B12 (173 pb) y Cgd2\_3850 (169 pb). Los alelos del locus CP47 fueron identificados como IIA29G10 (417pb) and IIA30G10 (420pb) por secuenciación, de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Gatei y col. (2007). Las secuencias representativas de algunos alelos identificados en este estudio han sido depositadas en GenBank con números de acceso MG924432, MG924434, MG924435, MG924444 a MG924446 y MG924450.

**Tabla 24 Alelos de diferentes microsatélites y minisatélites identificados mediante electroforesis capilar en aislados de *C. parvum* de terneros en Colombia. Tamaño ajustado tras secuenciación (pares de bases) y número asignado a cada uno para su análisis multilocus**

Locus Alelo (pb) (nº asignado)	Nº aislados (%) (n: 70)	Nº explotaciones (n: 32)
<b>ML1 [HGDI = 0,089 (0,000 – 0,182)]<sup>a</sup></b>		
226 (2)	3 (4,6)	3 (11,1)
238 (1)	62 (95,4)	24 (88,9)
<b>ML2 [HGDI = 0,822 (0,802–0,842)]</b>		
219 (2) <sup>c</sup>	11 (18)	5 (19,2)
231 (1)	15 (24,6)	5 (19,2)
233 (3)	11 (18)	6 (23,1)
235 (6)	2 (3,3)	2 (7,7)
237 (4)	11 (18)	8 (30,8)
245 (5) <sup>c</sup>	11 (18)	4 (15,4)

<b>Locus</b> <b>Alelo (pb) (n° asignado)</b>	<b>N° aislados (%)</b> <b>(n: 70)</b>	<b>N° explotaciones</b> <b>(n: 32)</b>
<b>TP14 [HGDI = 0,000 (0,000 – 0,101)]</b>		
324 (1)	67 (100)	30 (100)
<b>MSB [HGDI = 0,031 (0,000 – 0,089)]</b>		
316 (2)	1 (1,5)	1 (3,4)
322 (1)	64 (98,5)	28 (96,6)
<b>CP47 [HGDI = 0,239 (0,119 – 0,360)]<sup>b</sup></b>		
417 (1)	55 (85,9)	25 (89,3)
420 (2)	7 (10,9)	5 (17,9)
417 + 420	2 (3,1)	2 (2,1)
<b>MSC6-7 [HGDI = 0,058 (0,000 – 0,134)]</b>		
516 (2)	1 (1,5)	1 (3,5)
549 (1)	64 (97)	29 (100)
516 + 549	1 (1,5)	1 (3,5)
<b>5B12 [HGDI = 0,223 (0,098 – 0,347)]</b>		
167 (2)	7 (10,9)	6 (20,7)
169 (1)	56 (87,5)	24 (82,8)
173 (3) <sup>c</sup>	1 (1,6)	1 (3,5)
<b>Cgd2_3850 [HGDI = 0,459 (0,352 -0,566)]</b>		
169 (3) <sup>c</sup>	4 (6,1)	1 (3,2)
193 (1)	46 (69,7)	21 (67,7)
199 (2)	15 (22,7)	10 (32,3)
193 + 199	1 (1,5)	1 (3,2)
<b>Cgd6_5400 [HGDI = 0,190 (0,072 – 0,309)]</b>		
271 (3)	1 (1,6)	1 (3,7)
277 (1)	56 (88,9)	24 (88,9)
283 (2)	1 (1,6)	1 (3,7)
277 + 283	5 (7,9)	1 (3,7)
<b>GP60 [HGDI = 0,506 (0,363 – 0,650)]</b>		
liaA15G2R1 (1)	5 (7,6)	3 (9,7)
liaA16G2R1 (2)	3 (4,5)	1 (3,2)
liaA17G4R1 (3)	2 (3)	1 (3,2)
liaA18G5R1 (4)	46 (69,7)	22 (71)
liaA19G6R1 (5)	2 (3)	2 (6,5)
liaA20G5R1 (6)	3 (4,5)	3 (9,7)
liaA20G6R1 (7)	4 (6,1)	1 (3,2)
liaA20G7R1 (8)	1 (1,5)	1 (3,2)

<sup>a</sup> Índice discriminador de Hunter-Gaston (índice [intervalo de confianza 95%])

<sup>b</sup> Los alelos del locus CP47 fueron identificados como IIA29G10 (417pb) and IIA30G10 (420pb) mediante secuenciación, de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Gatei y col. (2007)

<sup>c</sup> Alelos no descritos previamente

El subtipo multilocus (MLT) de cada aislado fue determinado con base a la combinación de alelos en diez marcadores, incluyendo los nueve micro- y minisatélites y el subtipo obtenido por secuenciación de la GP60. Un total de 61 aislados procedentes de 26 explotaciones amplificaron correctamente para los 10 marcadores y

entre ellos se identificaron 22 MLTs, cuya composición y frecuencia aparece reflejada en la Tabla 25. Nueve aislados mostraron una infección mixta por dos alelos en alguno de los siguientes loci (CP47, cgd6\_5400, cgd2\_3850 y MSC6-7) y fueron desglosados y asignados al correspondiente MLT. Cabe destacar el hallazgo de cinco aislados con infección mixta por alelos de 277 pb y 283 pb en el locus Cgd6\_5400, todos los cuales procedían de la misma explotación en el municipio de Sopó (Tabla 25).

La mayoría de los MLTs (13/22) fueron únicos y distintivos de otras tantas explotaciones, mientras que los nueve restantes fueron compartidos por más de una explotación. Concretamente 3 MLTs fueron identificados en dos granjas (n: 3), 4 MLTs en tres granjas y 2 MLTs en cuatro explotaciones. En 18 de las 26 explotaciones se encontró infección por un único subtipo y en las restantes granjas se detectaron dos subtipos (n: 5), tres subtipos (n: 2) y hasta cuatro subtipos circulantes (n: 1).

La técnica multilocus incrementó considerablemente el poder discriminatorio de cada uno de los loci por separado y proporcionó un índice de Hunter-Gaston de 0,940 (95% IC 0,918 – 0,961). Dos fueron las variantes más prevalentes (MLT-13 y MLT-15), cada una de las cuales fue identificada en 10 aislados, aunque la mayoría de MLTs (n: 15) estaban representados en tan sólo 1-3 aislados de 22/26 explotaciones. Cabe destacar que la mayoría de loci fueron escasamente informativos, ya que la repetición del estudio multilocus combinando tan sólo los tres marcadores más discriminatorios ofrecía un índice muy similar [0,904 (95% IC 0,873 – 0,936)] y permitió identificar hasta 15 MLTs.

El análisis de poblaciones mediante el algoritmo eBURST reveló que la mayoría de MLTs (19/22) estaban relacionados por variantes de un solo locus y formaban un complejo clonal con una topología en forma de estrella, siendo el MLT-8 el miembro fundador (valor “bootstrap”: 80%). Un segundo complejo clonal estaba constituido por tan solo dos variantes (MLT-1 y MLT-2), cuya única diferencia entre ellas afectaba al subtipo GP60 (IIaA20G5R1 *versus* IIaA20G7R1). Finalmente, el MLT-16 fue el más divergente desde un punto de vista genético, al presentar diferencias en más de un locus con los MLTs restantes y no estar por tanto incluido en ningún complejo clonal. De hecho, este fue el único MLT que exhibía el alelo de 169 pb en el locus Cgd2\_3850 y el subtipo IIaA20G6R1 del gen GP60, siendo identificado en un total de cuatro aislados, todos ellos de la misma explotación (Tabla 26 y Figura 28).



**Tabla 25 Subtipos multilocus (MLTs) identificados entre aislados de *C. parvum* de terneros con Colombia en base a la combinación de alelos de nueve microsatélites/minisatélites y el locus GP60**

M LT	TP 14	MS B	MSC 6-7	M L1	Alelos identificados en cada locus <sup>a</sup>				M L2	GP 60	Nº aislado <sup>b</sup> (n: 70)	Nº granja s (n: 26)
					cgd6_5 400	5B 12	CP 47	cgd2_3 850				
1	1	1	1	1	1	2	1	2	4	6	3	3
2	1	1	1	1	1	2	1	2	4	8	1	1
3	1	1	1	1	1	2	2	1	2	4	3	2
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	3	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	3	4	4	3
9	1	1	1	1	1	1	1	1	6	4	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	5	3
11	1	1	1	1	1	1	1	1	4	5	2	2
12	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	5	4	10	4
14	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	2	2
15	1	1	1	1	1	1	1	2	1	4	10	4
16	1	1	1	1	1	1	1	3	2	7	4	1
17	1	1	1	1	1	1	2	1	3	4	1	1
18	1	1	1	1	1	1	2	1	6	4	1	1
19	1	1	1	1	1	1	2	1	2	4	4	3
20	1	1	1	1	2	1	1	1	5	4	5	1
21	1	1	1	1	3	1	1	1	3	1	1	1
22	1	1	2	1	1	1	1	1	5	1	1	1

<sup>a</sup> El número asignado a cada alelo aparece en la Tabla 24.

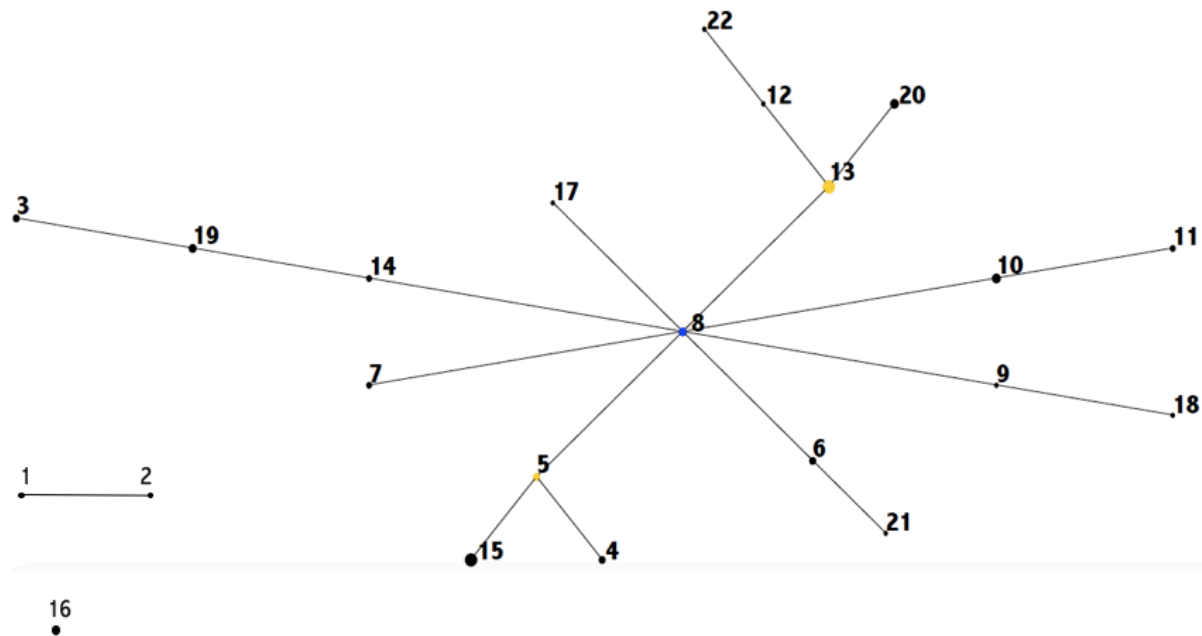
<sup>b</sup> Solamente se utilizaron para el análisis multilocus los aislados que amplificaron en los 10 marcadores. Las muestras con infección mixta en un marcador fueron desdobladas y asignadas al MLT correspondiente.

**Tabla 26 Análisis de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en terneros en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST (<http://eburst.mlst.net/>)**

ST	Frecuencia	SLV	DLV	TLV	SAT	Promedio distancia	Bootstrap subtipo	Subgrupo
<b>Grupo 1</b>								
8	4	8	8	2	0	1,66	67%	80%
13	10	7	9	2	0	1,72	39%	55%
5	3	7	8	3	0	1,77	24%	54%
14	2	6	10	2	0	1,77	8%	18%
10	5	6	9	3	0	1,83	4%	18%
9	1	6	9	3	0	1,83	3%	17%
6	3	4	9	4	1	2,11	3%	18%%
19	4	4	5	7	2	2,38	4%	12%%
12	1	3	10	4	1	2,16	0%	5%
17	1	3	8	6	1	2,27	0%	3%
18	1	3	6	7	2	2,44	0%	3%
7	2	2	10	5	1	2,27	0%	0%
4	3	1	10	6	1	2,38	0%	0%
11	2	1	9	7	1	2,44	0%	0%
20	5	1	6	10	1	2,61	0%	0%
15	10	1	6	8	3	2,72	0%	0%
21	1	1	3	10	4	3	0%	0%
3	3	1	3	5	9	3,33	0%	0%
22	1	1	2	10	5	3,11	0%	0%
<b>Grupo 2</b>								
1	3	1	0	0	0	1		
2	1	1	0	0	0	1		
<b>Singleton</b>								
16								

ST: subtipo. SLV: variantes de un solo locus. DLV: variantes de dos loci. TLV: variante de tres loci. SAT: satélites.

**Figura 28 Diagrama de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en terneros en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST. El diámetro de los puntos es proporcional al número de aislados y las líneas unen los MLTs relacionados por variantes de un solo locus. El perfil alélico de cada MLT se indica en la Tabla 25.**

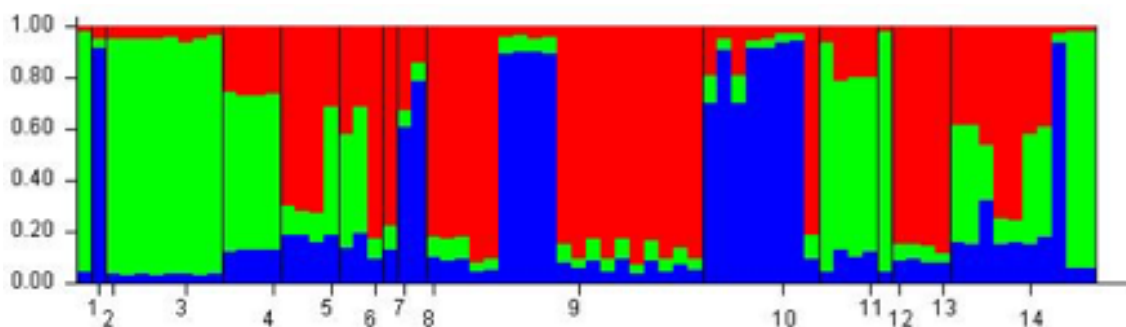


El valor del índice de asociación estandarizado como medida para determinar el desequilibrio de ligamiento entre los diferentes MLTs reveló evidencias de equilibrio y una estructura panmíctica predominante en la zona geográfica. El índice fluctúa desde 0 en caso de panmixia donde el intercambio genético se produce al azar hasta 1 conforme se incrementa el desequilibrio de ligamiento. En nuestro caso se confirmó la hipótesis nula, puesto que el valor fue muy bajo ( $I_A^s$ : 0,0186), el valor de varianza ( $V_D$ : 1,3196) era inferior al 95% del valor crítico ( $L$ : 1,3221) y las diferencias no fueron significativas ( $P$ : 0,056). Estos requisitos se hicieron más evidentes cuando el análisis se repitió incluyendo un solo individuo por cada MLT ( $I_A^s$ : 0,0051;  $V_D$ : 1,2365;  $L$ : 1,6017;  $P$ : 0,378).

Los resultados del análisis de estructura bayesiana se resumen en la Figura 29 donde las barras muestran la cantidad más probable de grupos ancestrales ( $K=3$ ). Cada barra corresponde a un aislado y los colores en cada barra representan su porcentaje de identidad con uno de los tres grupos. Para asignar un aislado a un grupo

se tuvo como punto de corte un valor mayor a 0,8 (eje y), de lo contrario se consideró que el aislado tenía un origen mixto. De esta manera, el 65,7% de los aislados pudieron ser asignados a uno de los tres grupos, pero los restantes fueron considerados de origen mixto.

**Figura 29** Análisis bayesiano de la estructura genética de aislados de *C. parvum* (n: 70)



## 2.2 GANADO PORCINO

El análisis microscópico de las muestras fecales de cerdos mediante la tinción ácido-resistente reveló la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en 15 animales (6,4%) procedentes de siete explotaciones ubicadas en tres municipios. La infección fue más común en animales en la etapa de precebo (n: 10; 14,9%), seguidos por los reproductores (n: 4, 5,4%) y la lactancia (1, 2,9%). No obstante, no se observó asociación estadística entre la infección por *Cryptosporidium* y la etapa de crianza.

Solamente 11 de los 233 cerdos muestreados padecían un cuadro diarréico acompañado de heces líquidas, cinco de la etapa de lactancia y seis de precebo. Estos animales pertenecían a cinco explotaciones distribuidas en cuatro municipios. Tres de estos animales, todos en fase de precebo y pertenecientes a dos granjas, estaban infectados por *Cryptosporidium*. El análisis estadístico demostró que la infección por este protozoo también mantiene una asociación significativa con la presencia de diarrea en esta especie animal ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (Tabla 27).

**Tabla 27 Prevalencia de *Cryptosporidium* en ganado porcino según la edad y presencia de diarrea**

Etapa	Infectados / estudiados (%)			
	Diarrea	No diarrea	P*	Total
Lactancia	0/5 (0%)	1/29 (3,5%)	NS	1/34 (2,9%)
Precebo	3/6 (50%)	7/61 (11,5%)	0,0115	10/67 (14,9%)
Levante	0/0 (0%)	0/36 (0%)	---	0/36 (0%)
Cebo	0/0 (0%)	0/22 (0%)	---	0/22 (0%)
Reproductores	0/0 (0%)	4/74 (5,4%)	---	4/74 (5,4%)
<b>Total</b>	<b>3/11 (27,3%)</b>	<b>12/222 (5,4%)</b>	<b>0,0039</b>	<b>15/233 (6,4%)</b>

\* P: valor obtenido al comparar el porcentaje de parasitación entre cerdos con y sin diarrea en cada grupo de edad.

El análisis molecular mediante el marcador ssu-rRNA únicamente proporcionó un amplicón del tamaño esperado en dos aislados de *Cryptosporidium*, ambos procedentes de animales adultos de la misma región, pero de diferentes granjas. Ambos aislados fueron identificados como *C. parvum* mediante análisis de restricción, hallazgo confirmado posteriormente por secuenciación. Las secuencias fueron idénticas a las depositadas en GenBank con números de acceso AF308600 y AF093490, respectivamente, ambas obtenidas de terneros en los Estados Unidos (Le Blancq y col., 1997; Xiao y col., 1999). Las secuencias identificadas fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso MF142035 y MF142036.

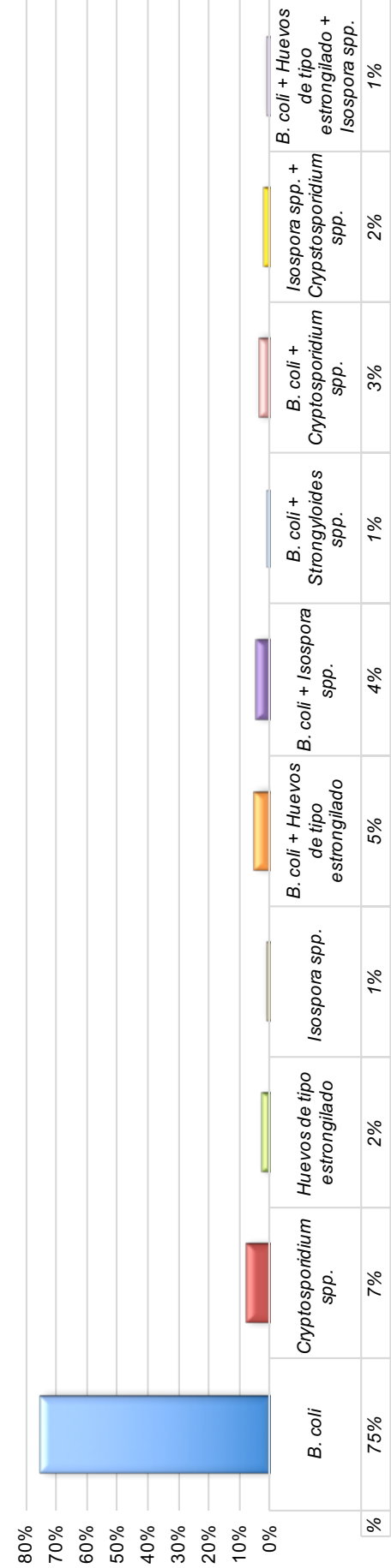
En el examen microscópico de los sedimentos obtenidos con la técnica de concentración también se identificaron otros parásitos. Concretamente, más de la mitad de los cerdos (126/233) estaban parasitados por determinados protozoos (*Balantidium coli*, *Isospora suis*) y/o nematodos (huevos estrangilados de *Oesophagostomum/Hyostrongylus*, huevos de *Strongyloides* spp). La infección por estos parásitos no estaba asociada a la presencia de diarrea y fue más común en animales de levante y ceba, seguido por adultos. El porcentaje de parasitación en estos tres grupos superaba el 70% de los animales, en comparación con los cerdos más jóvenes (lactación, cebo) donde se sitúa en torno al 25%. El estudio estadístico reveló diferencias significativas en el porcentaje de parasitación entre estas fases de crianza ( $P < 0,00001$ ,  $\chi^2$ ) (Tabla 28).

El parásito más prevalente fue *B. coli* (49,4%), mientras que los coccidios (*I. suis*) fueron identificados en aproximadamente el 4% de los cerdos. El porcentaje de cerdos parasitado por nematodos fue también bajo, en torno al 4%, circunstancia que estaría relacionada con los programas de desparasitación rutinaria que se siguen en las explotaciones objeto de estudio. Cabe destacar que *Cryptosporidium* fue el segundo parásito más prevalente. Algunos animales presentaron infecciones mixtas por *B. coli* + huevos de tipo estrongilado (n: 6), *B. coli* + *Isospora* spp. (n: 5), *B. coli* + *Strongyloides* spp. (n: 1), *B. coli* + *Cryptosporidium* spp. (n: 4), *Isospora* spp. + *Cryptosporidium* spp. (n: 2), incluso en una muestra se observaron tres géneros (*B. coli* + huevos de tipo estrongilado + *Isospora* spp.) (Figura 30).

Tabla 28 Prevalencia y distribución de parásitos gastrointestinales en ganado porcino

Etapas	Positivo (%)	B. coli (%)	Cryptosporidium spp. (%)	Huevos de tipo estrangulado (%)	Isospora spp. (%)	Strongyloides spp. (%)
Lactancia	10/34 (29,4%)	9 (26,5%)	1 (2,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Precebo	19/67 (28,4%)	12 (17,9%)	10 (14,9%)	3 (4,5%)	4 (6%)	0 (0%)
Levante	28/36 (77,8%)	28 (77,7%)	0 (0%)	5 (13,9%)	0 (0%)	0 (0%)
Ceba	17/22 (77,3%)	17 (77,3%)	0 (0%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)
Reproductores	52/74 (70,3%)	49 (66,2%)	4 (5,4%)	0 (0%)	4 (5,4%)	0 (0%)
Total	126/233 (54,1%)	115 (49,4%)	15 (6,4%)	10 (4,3%)	9 (3,9%)	1 (0,4%)

Figura 30 Distribución de los parásitos identificados en el total de muestras positivas



## 2.3 HUMANOS

### 2.3.1 Estudio microscópico

El examen microscópico de las muestras fecales humanas mediante la tinción ácido-resistente reveló la presencia de *Cryptosporidium* en 42 pacientes (6,3%). Aproximadamente la mitad de los pacientes estudiados (308/663) estaban afectados de un cuadro de diarrea y de éstos, 19 estaban infectados por *Cryptosporidium*. El estudio estadístico no reveló asociación estadísticamente significativa entre la infección por *Cryptosporidium* y la presencia de diarrea en el conjunto de la población investigada, aunque si se observó en los pacientes procedentes del Valle del Cauca ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (Tablas 29 y 30).

Por otra parte, también se observó una relación estadística en función de la procedencia y zona geográfica de origen de los casos positivos, siendo la infección por *Cryptosporidium* más probable entre los niños procedentes de colegios (10,7%) que en las muestras de origen hospitalario (4,9%) ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (OR: 2,33 IC 95%: 1,2333 – 4,4186) y entre individuos procedentes de las regiones Valle del Cauca y Nariño (12,5% y 12%, respectivamente) en comparación con los de la ciudad de Bogotá (4,7%) ( $P < 0,01$ ,  $\chi^2$ ). Concretamente, los niños del Valle del Cauca y de Nariño tienen 74,5% y 73,7%, respectivamente, más probabilidad de estar infectados que los niños de Bogotá (OR: 2,92 IC 95%: 1,05 – 8,13; OR: 2,80 IC 95%: 1,38 – 5,69, respectivamente) (Tabla 30).

**Tabla 29 Prevalencia de *Cryptosporidium* en humanos de acuerdo con la procedencia de las muestras y la presencia de diarrea**

Procedencia	Infectados / Estudiados (%)			
	Diarrea	No diarrea	$P^a$	Total
Colegio	4/38 (10,5%)	14/131 (10,7%)	NS	18/169 (10,7%)
Hospital	15/270 (5,6%)	9/224 (4%)	NS	24/494 (4,9%)
<b>Total</b>	<b>19/308 (6,2%)</b>	<b>23/335 (6,9%)</b>	<b>NS</b>	<b>42/663 (6,3%)</b>

<sup>a</sup>  $P$  valor obtenido al comparar el porcentaje de parasitación entre personas con y sin diarrea según la procedencia de la muestra.



**Tabla 30 Prevalencia de *Cryptosporidium* en humanos de acuerdo con la región de origen de las muestras y la presencia de diarrea**

Procedencia	Infectados / Estudiados (%)			Total
	Diarrea	No diarrea	P <sup>a</sup>	
Bogotá	11/266 (4,1%)	13/249 (5,2%)	NS	24/515 (4,7%)
Valle del Cauca	4/14 (28,6%)	1/26 (3,8%)	0,0241	5/40 (12,5%)
Nariño	4/28 (14,3%)	9/80 (11,3%)	NS	13/108 (12%)
<b>Total</b>	<b>19/308 (6,2%)</b>	<b>23/355 (6,5%)</b>	<b>NS</b>	<b>42/663 (6,3%)</b>

<sup>a</sup> P valor obtenido al comparar el porcentaje de parasitación entre personas con y sin diarrea según la zona geográfica de origen.

La presencia de otros parásitos intestinales diferentes a *Cryptosporidium* únicamente pudo investigarse en las muestras obtenidas durante el segundo año de estudio (n: 307), procedentes de hospitales y colegios localizados tanto en Bogotá, D.C., como en el Valle del Cauca y Nariño. La detección de estos endoparásitos se realizó mediante el examen microscópico directo de las heces. En total se identificó su presencia en muestras de 48 individuos (15,6%) y en seis de ellas había una infección mixta por al menos dos géneros de parásitos (Figura 31).

En la Tabla 31 se presenta la prevalencia según origen y zona geográfica de procedencia. *Cryptosporidium*, *Giardia duodenalis* y *Blastocystis* spp. fueron por este orden los parásitos más prevalentes, siendo identificados entre el 6,5% y 9,1% de las muestras, según el protozoo. Todas las especies restantes pertenecían a diferentes géneros de amebas y se diagnosticaron en aproximadamente el 1% de la población, siendo destacable el hecho de que todos estos individuos procedían de colegios del Departamento de Nariño.

La presencia de parásitos gastrointestinales, incluyendo *Cryptosporidium*, fue más frecuente entre los niños procedentes de colegios (32,5%) que entre las muestras de origen hospitalario (18%) ( $P < 0,0001$ ,  $\chi^2$ ) (OR: 3,22 IC 95% 1,78 – 5,81). Análogamente y al igual que se ha comentado anteriormente para los individuos infectados exclusivamente por *Cryptosporidium*, los parásitos gastrointestinales en conjunto fueron más frecuentes entre los individuos del Valle del Cauca y Departamento de Nariño que entre los de la ciudad de Bogotá (31,5-32,5% versus 16,4%) ( $P < 0,005$ ) (Tabla 32).

Aproximadamente un tercio de las muestras (109/307) procedían de pacientes afectados de diarrea y en 23 de ellas se identificó algún parásito gastrointestinal, aunque no se pudo establecer una asociación estadística entre parasitación y presencia de diarrea (Tabla 32). Por el contrario, sí se observó una relación significativa entre parasitación y edad de los individuos. Concretamente, la mayoría de personas infectadas se concentraron en la franja de 6 a 19 años (47/73: 64,4%), que tenían un riesgo de estar parasitados casi 3 veces superior al observado en niños menores de 5 años ( $P < 0,001$ ,  $\chi^2$ ) (OR:2,73 IC 95%: 1,58–4,69) (Tabla 33).

**Tabla 31 Prevalencia de diversos parásitos gastrointestinales en muestras fecales de 307 personas obtenidas en colegios y hospitales de tres regiones geográficas de Colombia**

Parásito	Origen			Zona geográfica			Total (n: 307)
	Colegio (n: 169)	Hospitales (n: 138)	Bogotá, DC (n: 159)	Valle del Cauca (n: 40)	Nariño (n: 108)		
<i>Cryptosporidium</i> spp.	18 (10,7%)	10 (7,2%)	10 (6,3%)	5 (12,5%)	13 (12%)	28 (9,1%)	
<i>Giardia duodenalis</i>	19 (11,2%)	4 (2,9%)	13 (8,2%)	7 (17,5%)	3 (2,8%)	23 (7,5%)	
<i>Blastocystis</i> spp.	16 (9,5%)	4 (2,9%)	3 (1,9%)	2 (5%)	15 (13,9%)	20 (6,5%)	
<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	4 (2,4/1,3%)	0	0	0	4 (3,7%)	4 (1,3%)	
<i>E. coli</i>	3 (1,8%)	0	0	0	3 (2,8%)	3 (0,98%)	
<i>Endolimax nana</i>	2 (1,2%)	0	0	0	2 (1,9%)	2 (0,65%)	
Total parásitos*	55 (32,5%)	18 (13%)	26 (16,4%)	13 (32,5%)	34 (31,5%)	73 (23,8%)	

\*Total niños parasitados sin tener en cuenta las infecciones mixtas.

**Tabla 32 Prevalencia de parásitos gastrointestinales en muestras fecales de 307 personas según la región de origen y presencia de diarrea**

Procedencia	Infectados / Estudiados (%)		
	Diarrea	No diarrea	Total <sup>b</sup>
Bogotá	8/67 (11,9%)	18/92 (19,6%)	NS 26/159 (16,4%)
Valle del Cauca	7/14 (50%)	6/26 (23,1%)	NS 13/40 (32,5%)
Nariño	8/28 (28,6%)	26/80 (32,5%)	NS 34/108 (31,5%)
Total	23/109 (10,1%)	50/198 (31,3%)	NS 73/307 (23,8%)

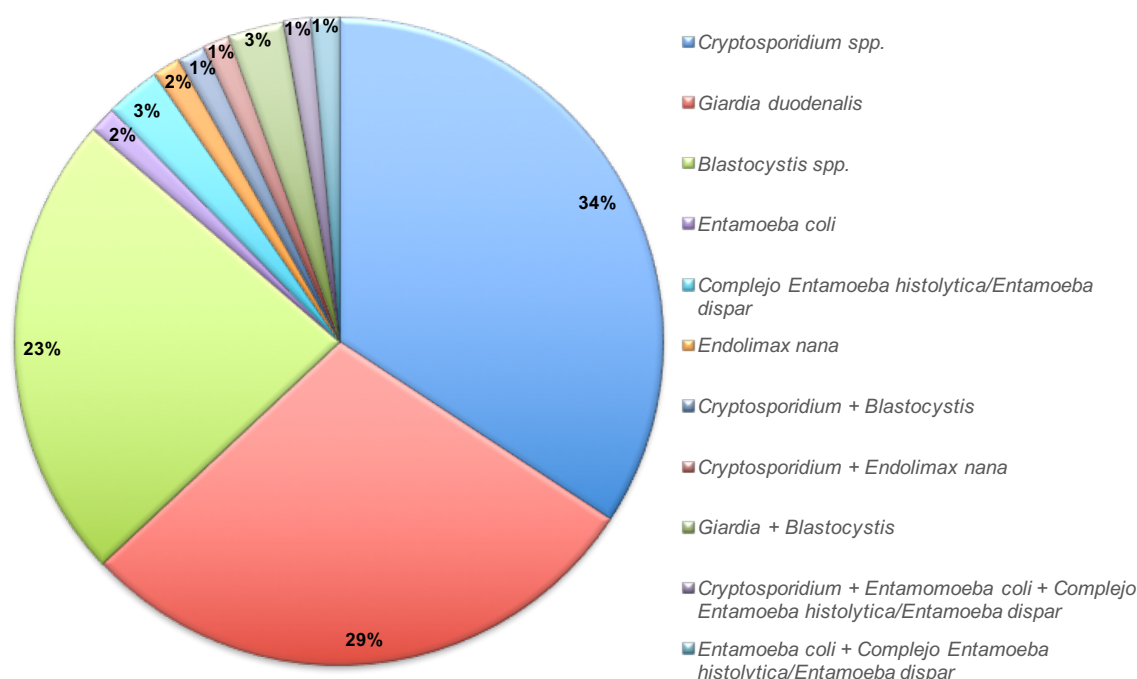
<sup>a</sup> P valor obtenido al comparar el porcentaje de parasitación entre personas con y sin diarrea según la zona geográfica de origen.

Tabla 33 Presencia de parásitos gastrointestinales en muestras fecales humanas según grupos de edad

EDAD*	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Total
<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	2	3	3	3	0	1	1	0	1	1	0	6	1	1	1	0	1	0	1	25
<i>Giardia duodenalis</i>	0	3	4	3	3	3	1	0	0	0	1	0	3	1	0	1	1	0	0	0	21
<i>Blastocystis</i> spp.	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	2	3	3	2	0	0	3	0	0	0	17
<i>Entamoeba coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Complejo <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>Endolimax nana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cryptosporidium</i> + <i>Blastocystis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Cryptosporidium</i> + <i>Endolimax nana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Giardia</i> + <i>Blastocystis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
<i>Cryptosporidium</i> + <i>Entamoeba coli</i> + Complejo <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Entamoeba coli</i> + Complejo <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>73</b>

\*Edad en años

**Figura 31 Distribución de parásitos gastroentéricos identificados en heces de humanos sobre el total de muestras positivas**



### 2.3.2 Estudio molecular

El análisis molecular de las muestras humanas positivas a *Cryptosporidium* permitió identificar la especie en 39 de los 42 aislados. La mayoría (n: 35) mostraron un patrón compatible con *C. parvum*, mientras que dos aislados obtenidos de sendos niños hospitalizados por enfermedad diarreica aguda fueron identificados como *C. hominis*. En las dos muestras restantes se detectó la presencia de ambas especies mediante la técnica de PCR en tiempo real con el marcador Lib13.

Los aislados de *C. parvum* secuenciados fueron idénticos al depositado en GenBank con número AF093490, excepto un aislado que fue muy similar (99%) a la secuencia de referencia AF308600, siendo la diferencia de tan sólo un nucleótido (Le Blancq y col., 1997; Xiao y col., 1999). Todos los aislados de *C. hominis* correctamente secuenciados fueron idénticos al obtenido de una persona en el Reino Unido y depositado con número de acceso KM085019 (Hadfield y col., 2015).

La identificación del subtipo de *Cryptosporidium* con base a la secuenciación del gen GP60 resultó negativa para la mayoría de aislados, a pesar de realizarse repetidos intentos, posiblemente por la mala calidad del ADN de partida y/o la presencia de inhibidores. Por esta circunstancia, el polimorfismo de este marcador fue investigado en base a las diferencias del tamaño de los fragmentos obtenidos tras ser amplificado según la técnica propuesta por Ramo y col. (2014). El producto de PCR de cada aislado fue incluido en la mezcla utilizada para analizar el polimorfismo de micro- y minisatélites mediante la técnica de análisis de fragmentos, cuyos resultados se indican en la Tabla 34.

La amplificación de diversos microsatélites y minisatélites también resultó negativa en la mayoría de aislados de *Cryptosporidium* de origen humano, probablemente por el mismo motivo que se comentó en el párrafo anterior. Solamente dos microsatélites (TP14, MSB) amplificaron de manera regular en la mayoría de los 39 aislados en los que se pudo identificar la especie y fueron seleccionados para realiza el análisis multilocus junto con el gen GP60 (Tabla 34).

El marcador GP60 fue positivo en 34 aislados, incluyendo *C. parvum* (n: 31), *C. hominis* (n: 2) y uno con una infección mixta por ambas especies. Todas las muestras de *C. parvum* expresaron el mismo alelo de 351 pb., incluyendo el aislado con una infección mixta, alelo que fue asignado al subtipo IIaA15G2R1 tras secuenciación de varias muestras. Los dos aislados de *C. hominis* también expresaron un único alelo de 384 pb en este caso, que tras la secuenciación fue asignado al subtipo IbA10G2. La escasa diversidad de este marcador queda reflejada por su bajo índice discriminatorio [HGDI = 0.114 (0.000 - 0.254)].

El locus MSB también fue poco informativo [HGDI = 0.187 (0.006 - 0.368)], ya que, a pesar de haberse observado cuatro alelos, la mayoría de aislados de *C. parvum* positivos a este locus (28 / 29) expresaron una misma variante de 322 pb., cuya secuencia fue idéntica al aislado de referencia JF342570 de un ternero en España (Quílez y col., 2011). El aislado de *C. parvum* restante expresó un alelo de 310 pb, Los dos aislados de *C. hominis*, expresaron alelos distintos, con tamaño de 280 y 286 pb, respectivamente, que fueron 100% homólogos a las secuencias de referencia KM222510 y KM222511 de humanos en España (Ramo y col., 2015).

El microsatélite TP14 fue el más discriminatorio de los tres marcadores [HGDI = 0.324 (0.132 - 0.516)], con la presencia de dos alelos de 321 pb (n: 3), 324 pb (n: 25) y una infección mixta por ambos alelos (n: 1) entre los aislados de *C. parvum*. El fragmento de 324 pb fue también identificado en un aislado de *C. hominis*, mientras que el otro expresaba un alelo de 333 pb. Los fragmentos de 324 pb y 333 pb fueron idénticos a las secuencias de los depositados en GenBank con números de acceso JF342561 y JF342562, respectivamente, obtenidos de terneros España (Quílez y col., 2011). El fragmento de 321 pb fue por el contrario un alelo nuevo, no descrito previamente en GenBank, que presentaba cuatro polimorfismos con respecto a la secuencia JF342561, incluyendo el triplete repetitivo (CAA) y un nucleótido adicional. Las secuencias de nucleótidos de los aislados de *Cryptosporidium* generadas en este estudio han sido depositadas en GenBank con los números de acceso MG924433, MG924436 a MG924443, MG924447 a MG924449, MG924455 y MG924456.

**Tabla 34 Especies de *Cryptosporidium* y alelos de tres locus (GP60 y dos microsateélites) identificados en aislados de origen humano en Colombia. El tamaño de los alelos fue ajustado tras secuenciación de un número representativo de aislados. Para cada locus se indica el índice discriminatorio de Hunter-Gaston (índice [intervalo de confianza 95%]) y el número asignado a cada alelo para realizar el estudio multilocus**

Nº aislado	Especie	GP60	TP14	MSB
		[HGDI = 0.114 (0.000 - 0.254)]	[HGDI = 0.324 (0.132 - 0.516)]	[HGDI = 0.187 (0.006 - 0.368)]
10JB	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
21JB	<i>C. hominis</i> + <i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
35JB	<i>C. parvum</i>	351 (1)	321(2) <sup>a</sup>	322 (1)
39JB	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
47JB	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
37H	<i>C. hominis</i>	384 (2)	333 (3)	280 (3)
39H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
46H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	322 (1)
47H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
49H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
51H	<i>C. hominis</i> + <i>C. parvum</i>	–	324 (1)	322 (1)
53H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
55H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
56H	<i>C. hominis</i>	384 (2)	324 (1)	286 (4)
62H	<i>C. parvum</i>	–	324 (1)	322 (1)
64H	<i>C. parvum</i>	–	324 (1)	322 (1)

Nº aislado	Especie	GP60	TP14	MSB
		[HGDI = 0.114 (0.000 - 0.254)]	[HGDI = 0.324 (0.132 - 0.516)]	[HGDI = 0.187 (0.006 - 0.368)]
65H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
255H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
23H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	–
32H	<i>C. parvum</i>	–	321(2) <sup>a</sup>	–
35H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
109H	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	–
6N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	321(2) <sup>a</sup>	–
31N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	322 (1)
32N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	321-324	322 (1)
35N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	310 (2)
40N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
67N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
69N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	–
102N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	–
107N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	–
52N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	322 (1)
108N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	–
114N	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	322 (1)
21V	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)
22V	<i>C. parvum</i>	–	324 (1)	322 (1)
23V	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	322 (1)
30V	<i>C. parvum</i>	351 (1)	–	322 (1)
43V	<i>C. parvum</i>	351 (1)	324 (1)	322 (1)

<sup>a</sup> Alelos no descritos previamente

La combinación de alelos de los tres marcadores incrementó el poder discriminatorio de cualquiera de ellos por separado [HGDI = 0.407 (0.158 – 0.655)] y fue utilizada para determinar el subtipo multilocus (MLT) de cada aislado. Un total de 22 aislados amplificaron correctamente para los 3 marcadores y entre ellos se identificaron 5 MLTs, cuya composición y frecuencia aparece reflejada en la Tabla 35. Entre los aislados de *C. parvum* se identificaron tres variantes, aunque la mayoría fueron asignados al MLT-1. Un aislado mostró una infección mixta por dos alelos en el locus TP14, que fueron desglosados y asignados al correspondiente MLT. Los dos aislados de *C. hominis* fueron asignados a sendos MLTs.

El análisis del estudio multilocus mediante el algoritmo eBURST reveló que los tres MLTs asignados a *C. parvum* estaban relacionados por variantes de un solo locus y formaban un complejo clonal donde el MLT más prevalente era el miembro fundador.



Los dos MLTs identificados en *C. hominis* eran claramente divergentes entre sí y presentaron alelos distintos a *C. parvum* en los 3 marcadores, exceptuando el alelo de 324 pb del locus TP14 que fue compartido por ambas especies (Tabla 36 y Figura 32).

El valor del índice de asociación estandarizado como medida para determinar el desequilibrio de ligamiento entre los diferentes MLTs fue analizado para *C. parvum*. Los datos analizados no permitieron rechazar la hipótesis nula, por lo que no se puede descartar la existencia de equilibrio de ligamiento y de predominio de la panmixia en la zona geográfica. Concretamente, el valor fue muy bajo ( $I_A^s$ : 0.0024), el valor de varianza ( $V_D$ : 0.2279) era inferior al 95% del valor crítico ( $L$ : 0.3972) y las diferencias no fueron significativas ( $P$ : 0.09). Este análisis no fue realizado para *C. hominis* debido al escaso número de aislados.

**Tabla 35 Subtipos multilocus (MLTs) identificados entre aislados de *C. parvum* y *C. hominis* de humanos en Colombia con base a la combinación de alelos de dos microsatélites y el locus GP60**

MLT	TP14	MSB	GP60	Nº aislados	Especie
1	1	1	1	17	<i>C. parvum</i>
2	1	2	1	1	<i>C. parvum</i>
3	1	4	2	1	<i>C. hominis</i>
4	2	1	1	2	<i>C. parvum</i>
5	3	3	2	1	<i>C. hominis</i>

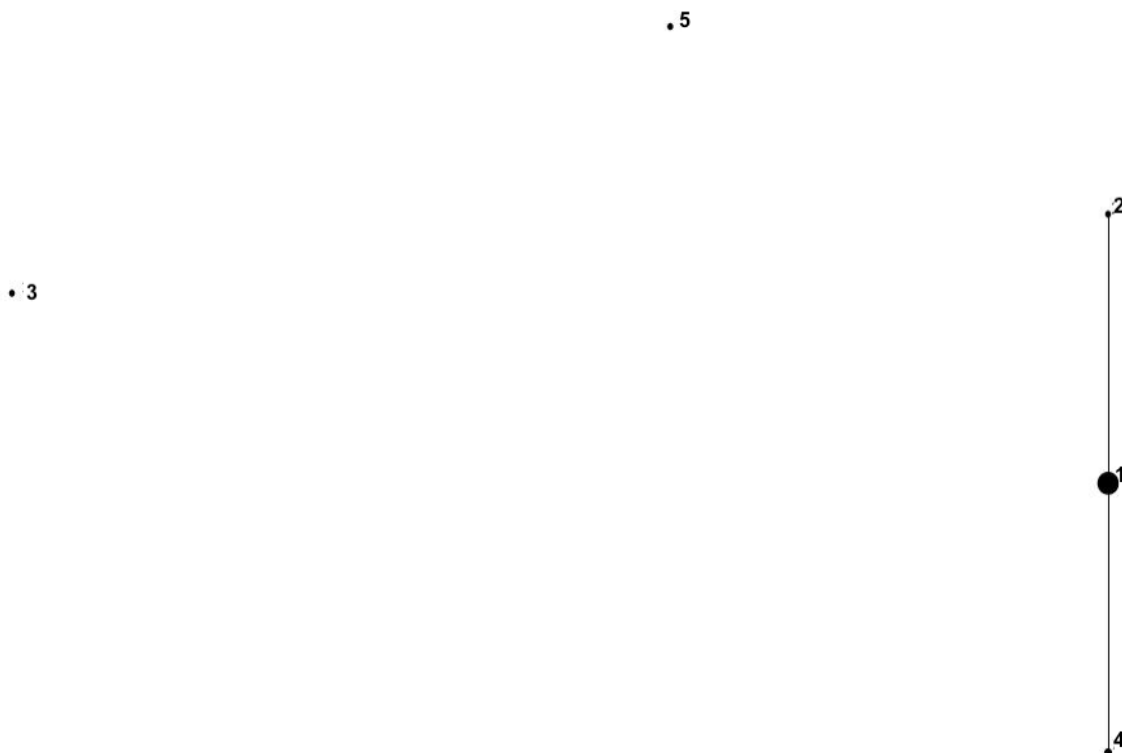
<sup>a</sup> El número asignado a cada alelo aparece en la Tabla 34.

**Tabla 36 Análisis de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en humanos en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST (<http://eburst.mlst.net/>)**

ST	Frecuencia	SLV	DLV	TLV	SAT	Promedio distancia	Bootstrap subtipo	Subgrupo
<b>Grupo 1</b>								
1	17	2	0	0	0	1,0	31%	0%
12	2	1	1	0	0	1,5	0%	0%
4	1	1	1	0	0	1,5	0%	0%
<b>Singletons</b>								
5								
3								

ST: subtipo. SLV: variantes de un solo locus. DLV: variantes de dos loci. TLV: variantes de tres loci. SAT: satélites.

**Figura 32** Diagrama de la relación entre los subtipos multilocus (MLTs) identificados en humanos en el presente estudio mediante el algoritmo eBURST. El diámetro de los puntos es proporcional al número de aislados y las líneas unen los MLTs relacionados por variantes de un solo locus. El perfil alélico de cada MLT se indica en la Tabla 35.



El estudio molecular de las muestras positivas a *Giardia* se llevó a cabo con 20 de los 23 aislados de origen humano identificados, confirmando la presencia de la especie *G. duodenalis* en todos ellos (Tabla 37). Un total de 16 muestras fueron correctamente secuenciadas en el locus *tpi*, revelando la presencia del subensamblaje All (n: 7) y ensamblaje B (n: 9). La comparación con aislados de referencia de GenBank mostró la homología (100%) del sub-ensamblaje All con las secuencias U57897 y KJ888992 (Baruch y col., 1996; Karim y col., 2015), mientras que los aislados del ensamblaje B fueron idénticos o muy similares (99%) a las secuencias de referencia AY228628 y KJ888985 (Sulaiman y col., 2003; Karim y col., 2015).

La amplificación y secuenciación de locus *bg* resultó positiva en 14 aislados, entre los que se incluía el subensamblaje All (n: 6) y ensamblaje B (n: 8). La

secuencia de los primeros fue idéntica a la de los aislados de referencia con número de acceso AY072723 ó AY072723, mientras que los aislados del ensamblaje B fueron homólogos a la secuencia AY072727, exceptuando un aislado con un polimorfismo de un solo nucleótido (Cacciò y col., 2002).

En las siete muestras que no amplificaron en los loci *tpi* y/o *bg* se intentó la identificación del ensamblaje en base al locus *ssu-rRNA*, obteniéndose secuencias legibles en todos ellos. Cuatro aislados fueron idénticos a la secuencia de referencia del ensamblaje B con número de GenBank KJ888984 y los tres restantes fueron identificados como ensamblaje A, con secuencias idénticas a KF843922 (Wang y col., 2014).

La combinación de los resultados obtenidos en los tres marcadores anteriormente mencionados permitió genotipar correctamente los 20 aislados de *G. duodenalis* y asignarlos a los ensamblajes/subensamblajes B (n: 11) y All (n: 7), junto con dos aislados adicionales del ensamblaje A en los que no se pudo identificar el subensamblaje porque solamente amplificaron con el locus *ssu-rRNA* (Tabla 37).

Diversas secuencias representativas obtenidas en este estudio han sido depositadas en GenBank con los números de acceso MG924430, MG924431, MG924451 a MG924454 y MG924457 a MG924462. La divergencia genética entre los ensamblajes A y B fue evidente mediante el análisis filogenético de las secuencias obtenidas en este trabajo y su comparación con aislados de referencia, tanto en el locus *bg* (Figura 33) como en el locus *tpi* (Figura 34).

**Tabla 37 Ensamblajes y subensamblajes identificados en diferentes aislados de *Giardia duodenalis* de origen humano en Colombia mediante análisis de los loci triosa fosfato isomerasa (*tpi*),  $\beta$ -giardina (*bg*) y ssu-rRNA**

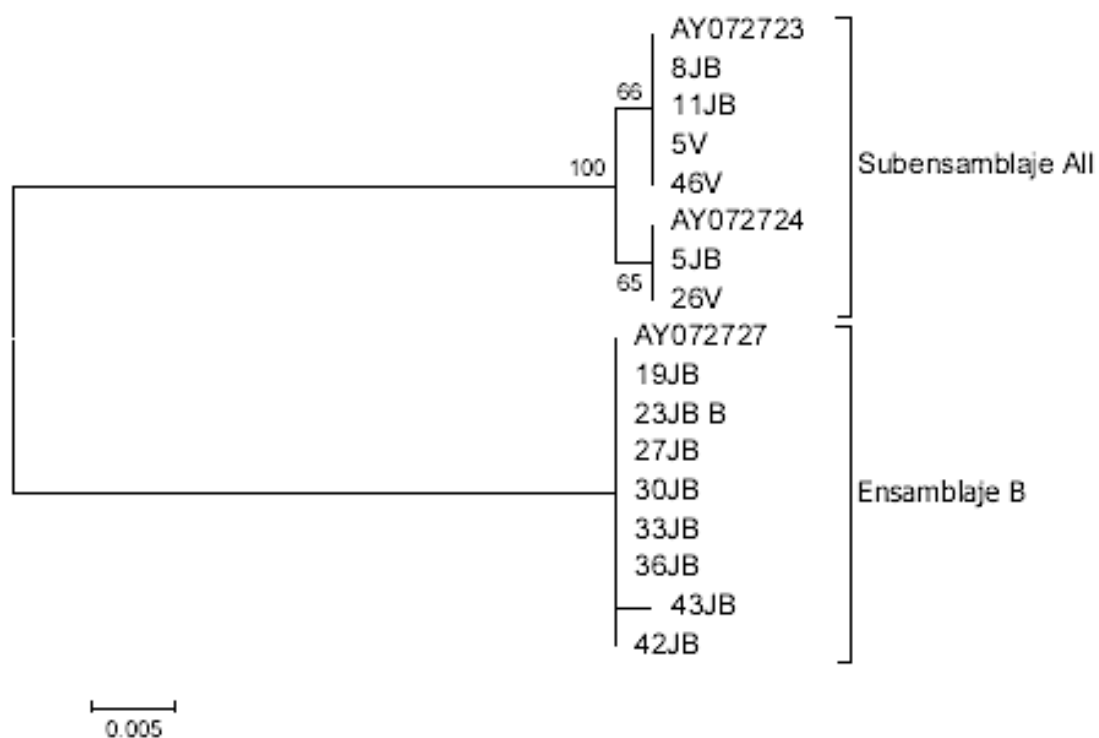
Aislado	<i>tpi</i>	<i>bg</i>	ssu-rRNA	Asignado
91H	---	---	B (100% KJ888984)	B
5JB	All (100% U57897)	All (100% AY072724)	---	All
8JB	All (100% U57897)	All (100% AY072723)	---	All
11JB	All (100% U57897)	All (100% AY072723)	---	All
14JB	B (100% AY228628)	---	B (100% KJ888984)	B
19JB	B (100% KJ888985)	B (100% AY072727)	---	B
23JB	B (100% AY228628)	B (100% AY072727)	---	B
27JB	B (100% AY228628)	B (100% AY072727)	---	B
30JB	B (99% AY228628) <sup>1</sup>	B (100% AY072727)	---	B
33JB	B (100% AY228628)	B (100% AY072727)	---	B
34JB	B (99% AY228628) <sup>2</sup>	---	B (100% KJ888984)	B
36JB	B (100% AY228628)	B (100% AY072727)	---	B
42JB	B (100% AY228628)	B (100% AY072727)	---	B
43JB	---	B (AY072727) <sup>3</sup>	B (100% KJ888984)	B
5V	All (100% U57897)	All (100% AY072723)	---	All
96N	---	---	A (100% KF843922)	A
105N	All (100% U57897)	---	A (100% KF843922)	All
25V	---	---	A (100% KF843922)	A
26V	All (100% KJ888992)	All (100% AY072724)	---	All
46V	All (100% U57897)	All (100% AY072723)	---	All

<sup>1</sup> Tiene un polimorfismo de sustitución con la secuencia AY228628

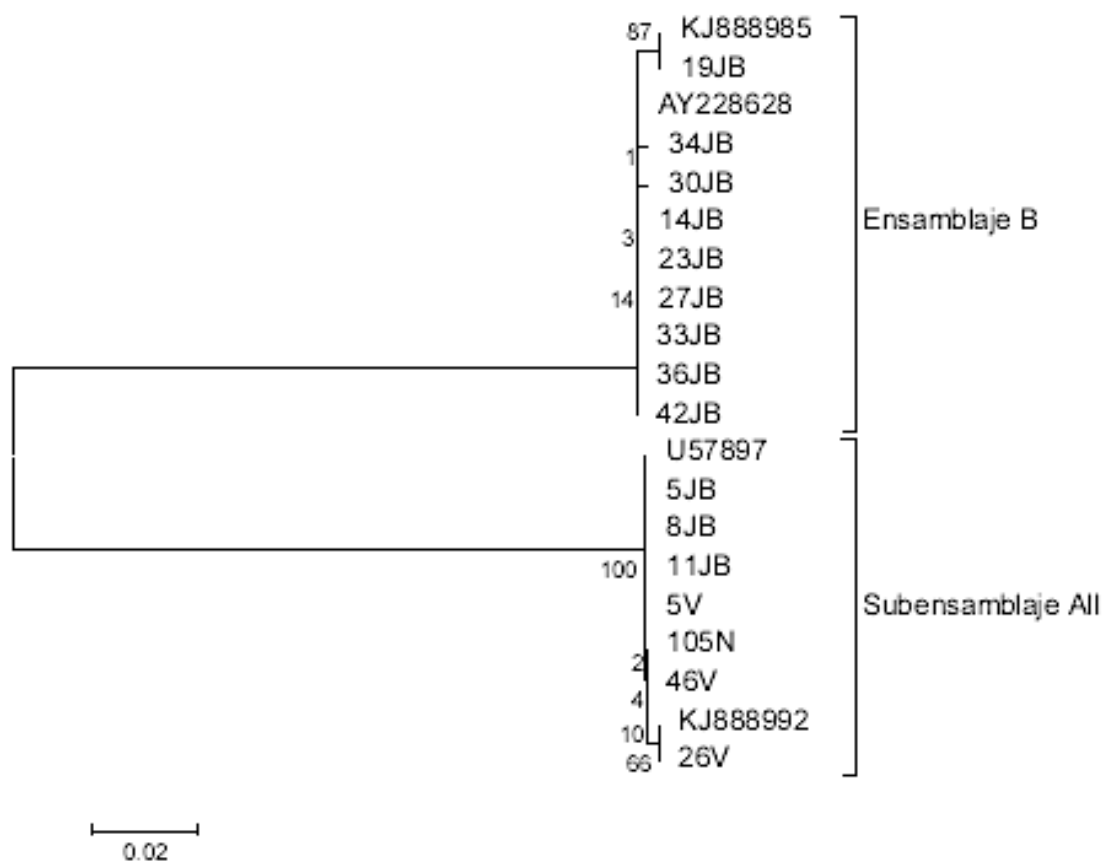
<sup>2</sup> Tiene un polimorfismo de sustitución con la secuencia AY228628

<sup>3</sup> Tiene un polimorfismo de sustitución con la secuencia AY072727

**Figura 33** Estudio filogenético de los aislados de *G. duodenalis* identificados en este trabajo y aislados de referencia de GenBank mediante análisis Neighbor-Joining del gen  $\beta$ -giardina. La distancia evolutiva ha sido estimada con el método de Tamura-Nei



**Figura 34** Estudio filogenético de los aislados de *G. duodenalis* identificados en este trabajo y aislados de referencia de GenBank mediante análisis Neighbor-Joining del gen *tpi*. La distancia evolutiva ha sido estimada con el método de dos parámetros de Kimura



## **3 DISCUSIÓN**

---





### 3.1 GANADO VACUNO

Los resultados obtenidos confirman que la infección por *Cryptosporidium* está ampliamente distribuida en las explotaciones de ganado vacuno de la zona central de Colombia, habiéndose identificado ooquistes en más del 26% de los terneros y casi el 60% de las explotaciones muestreadas. En Latinoamérica, concretamente en países como Brasil, Venezuela y Argentina, el porcentaje de parasitación por *Cryptosporidium* en terneros oscila entre el 10% y el 29,3%% (Surumay-Vílchez y Alfaro, 2000; Del Coco, y col., 2008; Paz e Silva y col., 2013). Los estudios realizados en Colombia señalan valores entre 4,9% en la Sabana de Bogotá y 48% en el Departamento de Boyacá, aunque el porcentaje se puede incrementar hasta el 90% en este último Departamento cuando sólo se tienen en cuenta los terneros menores de 12 meses (Hernández-Gallo y Cortés-Vecino, 2012; Pulido-Medellín, y col., 2014).

El presente estudio también revela que la infección por *Cryptosporidium* ya es detectable en los terneros a la edad de 3 días, con un alto porcentaje de terneros parasitados durante su primera semana de vida (22%). Estos hallazgos indican que muchos animales se infectan inmediatamente después del nacimiento, teniendo en cuenta que el ciclo biológico de este protozoo se ha estimado en unos 4 días y sugieren que el ambiente donde nacen puede estar altamente contaminado por ooquistes (Santín y Trout, 2008). No obstante, el porcentaje de parasitación alcanza el máximo en terneros de 8 a 14 días (40,7%) y la posibilidad de encontrar animales infectados se reduce significativamente a partir de los 21 días de edad. Estos resultados corroboran los registrados en otros estudios epidemiológicos de tipo transversal o longitudinal, donde se concluye que la criptosporidiosis del ganado vacuno es mucho más prevalente en los terneros durante las dos primeras semanas de vida (Castro-Hermida y col., 2002; Trotz-Williams y col., 2007; Santín y col., 2008).

Por otra parte, cabe destacar que los porcentajes registrados en este estudio constituyen probablemente una subestimación del valor real, en primer lugar porque cada animal fue muestreado una sola vez y también por la menor sensibilidad que la técnica de tinción utilizada ofrece en comparación con otros métodos, como las técnicas microscópicas que incluyen concentración previa de la muestra fecal o especialmente los métodos moleculares (Smith, 2008). La sensibilidad de la tinción negativa de Heine sobre frotis de heces sin concentrar se ha estimado en 76,6%

cuando se compara con una tinción de inmunofluorescencia aplicada sobre muestras concentradas con la técnica de sedimentación con éter etílico, aunque la sensibilidad se incrementa a 90% si las heces contienen más de 10.000 ooquistes/gr (Chartier y col., 2013). Análogamente, las investigaciones de Ezzaty Mirhashemi y col. (2015) han demostrado que las técnicas de PCR basadas en la amplificación del gen *SSU rRNA* son mucho más sensibles que los métodos microscópicos o inmunológicos para detectar el parásito en muestras fecales de terneros.

En definitiva, en la interpretación de nuestros hallazgos se debe tener en cuenta que los terneros con infecciones de baja intensidad (ej. animales sin diarrea) o aquéllos parasitados por especies que producen menor número de ooquistes podrían no haber sido correctamente diagnosticados con la técnica de tinción utilizada (Santín y Trout, 2008). En este sentido, algunos investigadores han comprobado que el dominio abrumador de *C. parvum* en cuanto a ooquistes eliminados en heces se refiere, hace que se pasen por alto muchas infecciones por *C. bovis* que puedan afectar de manera concomitante a los terneros (Feng y col., 2007).

La etiología multifactorial del síndrome de diarrea neonatal del ternero está ampliamente documentada en la bibliografía científica, así como el papel que desempeña *Cryptosporidium*, que junto con los rotavirus son los microorganismos más prevalentes (Meganck y col., 2015). No obstante, la información sobre su relevancia en la ganadería bovina colombiana es muy limitada. Las investigaciones de Pardo y Oliver (2012) en la zona centro del país con una prueba de antígeno ELISA identificaron *Cryptosporidium* como microorganismo más frecuente en terneros con diarrea (38%), seguido de rotavirus (19%). Más recientemente y utilizando una técnica diagnóstica similar, Cadavid-Betancur y col. (2014) encontraron cifras incluso superiores entre los terneros de granjas del norte del país, con porcentajes de parasitación del 89% para *Cryptosporidium* y 47% para rotavirus.

En el presente estudio no se investigó la presencia de bacterias o virus en la etiología del síndrome diarreico de los terneros. Sin embargo, los resultados obtenidos revelan que la probabilidad de padecer diarrea es hasta 7 veces superior en animales parasitados por *Cryptosporidium* en comparación con los no infectados, lo cual sustenta su importancia como uno de los enteropatógenos más importantes en la región central de Colombia donde se ha llevado a cabo el trabajo. De hecho, el

porcentaje de parasitación fue realmente elevado en algunos grupos de edad (54% en terneros menores de 7 días, 82% en terneros de 8-14 días).

Por otra parte, cabe destacar que un elevado porcentaje de terneros pueden estar parasitados de forma asintomática, en nuestro caso 68/115 (59%), circunstancia por la cual plantean importantes riesgos desde un punto de vista epidemiológico y de salud pública que *a priori* resultan inaparentes. En primer lugar, porque diseminan la enfermedad al contaminar con sus heces los apriscos y las instalaciones ganaderas. En segundo lugar, por el riesgo que suponen como fuente de contagio para el ser humano en caso de estar infectados por especies de *Cryptosporidium* potencialmente zoonóticas, bien por contacto directo o por contaminación de alimentos o agua de bebida.

El estudio molecular de los aislados ha revelado que *C. parvum* es la especie claramente predominante durante el primer mes de vida de los terneros en esta zona de Colombia, ya que todos los aislados fueron asignados a esta especie exceptuando dos que fueron identificados como *C. bovis*. Este hallazgo coincide con la distribución de especies de *Cryptosporidium* en ganado vacuno de leche y carne en la mayoría de países europeos, Norteamérica, Australia o Nueva Zelanda, donde se ha demostrado que *C. parvum* es responsable de la mayoría de las infecciones durante la fase de lactación, mientras que otras especies como *C. bovis* y *C. ryanae* predominan en terneros mayores de 3 meses o novillas y en el ganado vacuno adulto es más prevalente *C. andersoni* (Trotz-Williams y col., 2006; Fayer y col., 2007; Broglia y col., 2008; Quílez y col., 2008; Brook y col., 2009; Ng y col., 2012; Rieux y col., 2013; Smith y col., 2014; Al Mawly y col., 2015).

Los escasos datos disponibles sobre las especies de *Cryptosporidium* que infectan el ganado vacuno en Latinoamérica también confirman el predominio de *C. parvum* en terneros lactantes. De hecho, ésta fue la única especie identificada en Argentina o Brasil (Tomazic y col., 2013; Del Coco y col., 2014; Do Couto y col., 2014), así como en un estudio previo realizado en un municipio de Colombia con once aislados obtenidos de diferentes granjas (Ocampo y col., 2012). No obstante, cabe destacar que este patrón de distribución no es uniforme, ya que en granjas de ganado vacuno de algunos países se ha demostrado que durante la etapa de lactación pueden ser mayoritarias otras especies como *C. bovis*, como por ejemplo en zonas de Suecia,

China, Canadá o Etiopía (7/10) (Silverlås, Näslund y col., 2010; Wang y col., 2011; Budu-Amoako y col., 2012; Wegayehu y col., 2016).

Aunque la mayoría de aislados se clasificaron como *C. parvum*, no todos fueron genéticamente uniformes, tal como demuestra su caracterización molecular en base al polimorfismo del locus GP60. Concretamente, se identificaron 8 subtipos de la familia IIa, considerada la principal familia de subtipos zoonóticos de *C. parvum* en ganado vacuno en todo el mundo (Santín y Trout, 2008). Tres subtipos (IIaA19G6R1, IIaA20G6R1, IIaA20G7R1) no han sido descritos previamente, por lo que se consideran variantes de nueva descripción, mientras que otros cuatro (IIaA15G2R, IIaA16G2R1, IIaA17G4R1, IIaA20G5R1) sí han sido identificados anteriormente en humanos y ganado vacuno y deberían por tanto ser considerados subtipos potencialmente zoonóticos (Trotz-Williams y col., 2006; Waldron y col., 2009; Zintl y col., 2009; Chalmers y col., 2011; Waldron y col., 2011a, 2011b; Mercado y col., 2015). Los tres subtipos de nueva descripción y la variante IIaA20G5R1 fueron identificados exclusivamente en terneros sin diarrea, aunque no se pudo demostrar una asociación estadística entre la infección por determinados subtipos y la presencia o ausencia de diarrea.

El locus GP60 codifica dos glucoproteínas de 15 y 45 KDa involucradas en la unión de los esporozoítos a las células hospedadoras y su posterior penetración. Dado que este proceso es crucial en la patogenia de la enfermedad, se considera que ambas glucoproteínas son determinantes en la virulencia de los aislados y que pueden estar bajo la selección inmune del hospedador, lo que podría explicar el amplio polimorfismo de este locus (Li y col., 2013). Sin embargo y al igual que se ha observado en otros estudios, los polimorfismos de secuencia de los subtipos identificados en este trabajo de Colombia son sinónimos, es decir, que no se traducen en cambios del aminoácido codificado por el codón. De hecho y como se ha mencionado en el párrafo anterior, no se pudo demostrar ninguna asociación entre determinados subtipos y el padecimiento de un síndrome diarreico por parte de los terneros, todo lo cual indicaría que los polimorfismos de estas glucoproteínas que dan origen a los diferentes subtipos no se relacionan con la patogenicidad del parásito.

Un hallazgo relevante del presente estudio está representado por la identidad del subtipo mayoritario de *C. parvum*, que revela el carácter distintivo de los aislados del parásito que circulan en las explotaciones de ganado vacuno en esta zona de

Colombia. En concreto, más del 66% de las infecciones en terneros estuvieron causadas por el subtipo IIaA18G5R1, una variante muy poco común que se detectó en el 68% de las granjas y en 12/16 municipios. Es de destacar que la secuencia de este subtipo fue idéntica a la depositada en GenBank con número de acceso AF022929, perteneciente al aislado NINC1 de un ternero de Iowa y utilizado Strong y col. (2000) en la clonación y secuenciación del gen GP60. Curiosamente, hasta el momento no se han descrito infecciones naturales en terneros o humanos por esta variante, circunstancia que justifica su rareza (Xiao y col., 2007).

Asimismo, cabe señalar el papel secundario que en esta zona geográfica parece desempeñar el subtipo IIaA15G2R1, que en la mayor parte del mundo se considera la variante dominante en terneros y uno de los principales subtipos zoonóticos de *C. parvum* (Ryan y col., 2014). En este estudio fue el segundo subtipo más prevalente, pero solamente se identificó en 9/71 terneros de 5/32 explotaciones. Las secuencias de dos subtipos (IIaA20G5R1 y IIaA16G2R1) fueron idénticas a aislados de *C. parvum* previamente identificados en humanos o ganado vacuno en Canadá, Australia, Irlanda y/o el Reino Unido y han sido depositadas en GenBank (números de acceso MF142043 y MF142044, respectivamente) (Trotz-Williams y col., 2006; Waldron y col., 2009; Zintl y col., 2009; Chalmers y col., 2011). Por el contrario, las secuencias de los aislados identificados como subtipo IIaA17G4R1 (número acceso MF142039) presentaban cuatro y seis polimorfismos, respectivamente, con aislados identificados en humanos y ganado vacuno en Australia (Waldron y col., 2011).

Los subtipos de *C. parvum* que infectan al ganado vacuno en Sudamérica son prácticamente desconocidos, ya que las publicaciones al respecto son muy limitadas. El subtipo IIaA15G2R1 fue el único identificado en sendos estudios realizados con unos pocos aislados de terneros en granjas de Brasil (Meireles y col., 2011; Silva y col., 2013), aunque un trabajo posterior con un número de muestras más representativo identificó hasta ocho subtipos: IIaA14G2R2, IIaA16G3R2, IIaA18G1R1, IIaA18G2R2, IIaA19G2R1, IIaA19G2R2, IIaA20G2R1 and IIaA20G2R2 (do Couto y col., 2014). La información disponible es también muy reducida en Chile, con una sola publicación relativa a la coexistencia de tres subtipos (IIaA17G4R1, IIaA16G4R1, IIaA15G4R1) tras clonar el amplicón del locus GP60 de un aislado de *C. parvum* de un ternero inicialmente caracterizado como subtipo IIaA17G4R1 (Mercado y col., 2015).

En Argentina destacan dos estudios que revelan una variabilidad moderada. Uno de ellos identificó seis subtipos, todos curiosamente con un solo triplete de la secuencia TCG (IIaA17G1R1, IIaA18G1R1, IIaA20G1R1, IIaA21G1R1, IIaA22G1R1 and IIaA23G1R1), a partir de muestras de 45 terneros en granjas de leche y carne ubicadas en las provincias de Buenos Aires, Santa Fé y Córdoba (Tomazic y col., 2013). La mayoría de estas variantes fueron observadas en una segunda publicación, donde se identifican siete subtipos (IIaA16G1R1, IIaA18G1R1, IIaA19G1R1, IIaA20G1R1, IIaA21G1R1, IIaA22G1R1, IIaA23G1R1), en este caso en muestras de 73 terneros de granjas lecheras de la provincia de Buenos Aires (Del Coco y col., 2014). Un hallazgo relevante viene determinado porque solo uno de los subtipos anteriormente mencionados, concretamente la variante IIaA18G1R1, es compartida por las explotaciones de diferentes países de Latinoamérica, y únicamente dos subtipos de entre todos ellos (IIaA15G2R1, IIaA17G4R1) fueron identificados en el presente trabajo realizado en granjas de Colombia. Esta circunstancia pone de manifiesto el aislamiento geográfico de las cepas de *C. parvum* que circulan en las explotaciones de ganado vacuno en algunos países de Sudamérica.

Según se ha podido comprobar tras la revisión bibliográfica, el presente trabajo constituye el primer estudio multilocus donde se aborda la diversidad intraespecífica de *C. parvum* en base al polimorfismo de diversos microsatélites y minisatélites en un país de Sudamérica. En el mismo se ha utilizado un panel de nueve marcadores, junto con el locus GP60, cuya selección se realizó en base a estudios previos del equipo de investigación solicitante y, de hecho, todos los marcadores excepto uno (TP14) presentaron diversos grados de polimorfismo (Ramo y col., 2016a, 2016b). Asimismo, conviene destacar el hallazgo de varios alelos de nueva descripción en tres loci (ML2, 5B12 y Cgd2\_3850).

Tres marcadores destacan como los más discriminatorios (ML2, GP60, Cgd2\_3850), mientras que el resto fueron escasamente informativos o incluso monomórficos y aportaron muy poco o nada al poder discriminatorio del estudio multilocus, circunstancia que apoya la importancia de este tipo de trabajos preliminares para seleccionar los marcadores más adecuados. De hecho, el índice discriminatorio de Hunter-Gaston apenas se vio mermado cuando en el estudio multilocus se incluían sólo los tres loci mencionados al comienzo de este párrafo y se excluían los restantes. No obstante, los estudios comparativos han confirmado que no existe un panel universal de marcadores, ya que el potencial de algunos puede variar

considerablemente según la especie de *Cryptosporidium*, el hospedador de origen o incluso la zona geográfica de estudio.

Por ejemplo, según diversos investigadores y en consonancia con los hallazgos del presente estudio, hay marcadores muy informativos para *C. hominis* pero de menos interés para caracterizar *C. parvum* (CP47, MSB, MSC6-7, ML1), mientras que otros son mucho más discriminatorios para *C. parvum* (ML2) (Quílez y col., 2011; Herges y col., 2012; Robinson y Chalmers, 2012). Una mención especial sería el caso del microsatélite TP14, que según estudios previos realizados en España se encontraría entre los más discriminatorios y que en el presente estudio no mostró ninguna variabilidad, circunstancia que apoya la afirmación anteriormente señalada sobre las repercusiones de la zona geográfica en el potencial de un determinado marcador (Quílez y col., 2011; Ramo y col., 2016a). La especie animal de origen del aislado también parece tener gran importancia, según se desprende de otros trabajos realizados en España, donde algunos loci fueron mucho más discriminatorios para caracterizar aislados de corderos y cabritos (MSB, ML1), mientras que otros lo fueron para aislados de terneros (ML2, 5B12) (JQuílez y col., 2013; Ramo, y col., 2016b).

En cualquier caso, el estudio multilocus demuestra que la diversidad genética de los aislados es muy superior a la obtenida mediante secuenciación del locus GP60. Concretamente, se identificaron 22 subtipos multilocus (MLTs) con el panel completo de marcadores, en comparación con 8 las variantes detectadas en base al polimorfismo de la GP60. Esta complejidad genética se puede considerar moderada, similar a la observada en terneros de granjas del Reino Unido utilizando un panel de 6 loci (23 MLTs), pero mucho más reducida a la detectada en España (59 - 70 MLTs) o Irlanda (78 MLTs) (Quílez y col., 2011; de Waele y col., 2013; Hotchkiss y col., 2015; Ramo y col., 2016a).

Otro hallazgo interesante está representado porque más de la mitad de los MLTs identificados (13/22) fueron únicos y distintivos de otras tantas explotaciones, circunstancia que sustenta el interés de este tipo de estudios multilocus para investigar el origen de brotes de criptosporidiosis y que constata el carácter endémico de la criptosporidiosis en muchas granjas de ganado vacuno. En estas explotaciones, es muy probable que la enfermedad se mantenga por la expansión de aislados genéticamente únicos a partir de ooquistes que permanecen viables en las zonas de parto durante periodos prolongados y ocasionan la infección de los terneros conforme

éstos van naciendo. El escaso movimiento o intercambio de animales entre explotaciones, así como la reposición a partir de terneros jóvenes de la misma granja también favorecería esta circunstancia (Morrison y col., 2008). Esta misma observación se ha realizado en granjas del Reino Unido (Hotchkiss y col., 2015) y en explotaciones bovinas y ovinas de España, donde la mayoría de MLTs identificados (54/70 y 64/74, respectivamente) fueron distintivos de otras tantas explotaciones (Ramo y col., 2016a, 2016b).

Los resultados del algoritmo eBURST revelan que la mayoría de MLTs están relacionados por variantes de un solo locus, lo que indicaría un bajo grado de divergencia genética. De hecho, el análisis bayesiano arrojó un valor de  $K=3$  como el número más probable de poblaciones ancestrales, en alguna de las cuales quedaron asignados aproximadamente 2/3 de la totalidad de aislados. Por otra parte, el análisis de ligamiento mostró evidencias de equilibrio, propio de una estructura predominantemente panmíctica donde el intercambio genético entre los aislados se produce al azar.

Los datos disponibles sobre la estructura de poblaciones de *C. parvum* en explotaciones de ganado vacuno se refieren en su mayor parte a Europa o Estados Unidos y proporcionan resultados e interpretaciones variables, circunstancia que evidenciaría las diferencias en los patrones de transmisión de la enfermedad según la zona geográfica. Un cuadro típico de panmixia, similar al observado en este estudio, se ha encontrado en explotaciones de Irlanda o España (de Waele y col., 2013; Ramo, y col., 2016a). Sin embargo, en otros países como Italia se ha demostrado que las poblaciones del parásito presentan un patrón tendente a la clonalidad (Drumo y col., 2012), mientras que en Estados Unidos o Escocia parecen mantener una estrategia reproductiva más flexible, que puede variar de clonal a panmíctica según la zona geográfica (Mallon y col., 2003; Morrison y col., 2008).

Este trabajo de investigación constituye el primer estudio molecular a gran escala sobre la diversidad genética de *C. parvum* en explotaciones de ganado vacuno de la región central de Colombia, utilizando por primera vez un panel con nueve microsatélites y minisatélites, junto con el locus GP60. La técnica ha resultado de gran utilidad para desentrañar la diversidad genética de *C. parvum* y el carácter distintivo de los aislados en esta zona geográfica, y demuestra la conveniencia de llevar a cabo



estudios similares para confirmar si esta circunstancia se hace extensiva a otras zonas geográficas del país.

### 3.2 GANADO PORCINO

Las parasitosis constituyen en una de las principales causas de pérdidas económicas para la industria porcina, ya que si bien muchos de estos procesos tienen curso subclínico, la parasitación se traduce en una reducción del índice de conversión del alimento y por lo tanto de la ganancia de peso (Jankowska-Mąkosa y Knecht, 2015; Weng y col., 2005). Diversos estudios han demostrado que los parásitos pueden reducir la ingesta de alimento en el ganado porcino hasta un 5% y mermar la ganancia de peso hasta un 31% (Kipper y col., 2011).

Los hallazgos del presente estudio confirman que el ganado porcino es un hospedador natural de *Cryptosporidium* en el Departamento de Cundinamarca y constituyen la primera cita de infección en este hospedador en Colombia. La prevalencia global no fue elevada (6,4%), pero destaca el hecho de que *Cryptosporidium* fue el segundo parásito intestinal más frecuente, por detrás de *Balantidium coli*, así como el incremento del porcentaje de parasitación (15%) en la fase de precebo, correspondiente a lechones de entre 20 días y algo más de 2 meses. Los valores de prevalencia registrados en diversas partes del mundo son muy variables, en gran parte como consecuencia de las diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas. Así se han realizado estudios en España (22,5-34,4%) (Quílez y col., 1996; Suárez-Luengas y col., 2007), Dinamarca (31,9%) (Maddox-Hyttel y col., 2006) Estados Unidos (5,4%) (Atwill y col., 1997), China (33-55,8%) (Chen y col., 2011; Zhang y col., 2013; Lin y col., 2015), Japón (32,6%) (Yui y col., 2014) o Zambia (44,2%) (Siwila y Mwape, 2012).

Un aspecto que se constata en muchas publicaciones y que también se ha confirmado en el presente estudio es que la infección por *Cryptosporidium* en esta especie animal, a diferencia de lo que ocurre en rumiantes, es más prevalente tras el destete de los lechones que durante la fase de lactación. Esta circunstancia se ha relacionado con la transferencia de inmunidad lactogénica que protegería los animales durante los primeros días de vida, mientras que el estrés consecutivo al destete

actuaría como factor desencadenante para incrementar la receptividad al parásito (Guselle y col., 2003).

De hecho y tal como se ha indicado anteriormente, la mayoría de los lechones parasitados por *Cryptosporidium* en nuestro estudio (10/15) pertenecían a la fase de precebo y solamente un lechón lactante resultó estar infectado. Otros investigadores también señalan que las mayores cifras de prevalencia se concentran en cerdos mayores de 1 mes y menores de 6 meses (Atwill y col., 1997; Maddox-Hyttel y col., 2006; Misic y col., 2003; Vítovec y col., 2006; Petersen y col., 2015). En España, Quílez, y col. (1996) no detectaron la infección en lechones lactantes o cerdas adultas, pero observaron que *Cryptosporidium* era muy prevalente en lechones destetados, lo que se denomina en fase de transición (59,2%), así como en cerdos de engorde (34,3%).

Al igual que ocurre en otras especies animales, la infección por *Cryptosporidium* también se pueden traducir en la aparición de un cuadro diarreico en el ganado porcino. Así se ha demostrado mediante infecciones experimentales en lechones menores de 2 semanas, aunque el curso es subclínico si la inoculación se realiza en lechones de más edad (Moon y Bemrick, 1981; Tzipori y col., 1981; Tzipori y col., 1982; Vítovec y Koudela, 1992). Sin embargo, la mayoría de publicaciones relativas a infecciones naturales constatan que la infección cursa normalmente de forma asintomática y con escasa eliminación de ooquistes, no habiéndose demostrado una asociación estadística entre infección por *Cryptosporidium* y diarrea en esta especie animal (Adesiyun y Kaminjolo, 1994; Quílez y col., 1996; Hamnes y col., 2007).

En el presente trabajo, sólo 3 de los cerdos parasitados por *Cryptosporidium* tenían diarrea, todos ellos en fase de precebo y uno de ellos estaba también infectado por *Isospora suis*. No obstante, no se llegaron a excluir otros enteropatógenos que también podrían haber desencadenado el cuadro clínico en estos animales. Cabe señalar que los procesos diarreicos en lechones en lactación y destete tienen normalmente etiología multifactorial, pudiendo participar diversas bacterias o virus en ocasiones de forma concomitante y donde *Cryptosporidium* podría intervenir agravando el cuadro clínico antes que como patógeno primario desencadenante del mismo (de Graaf y col., 1999).

El ganado porcino es receptivo a la infección por diversas especies de *Cryptosporidium*, según se ha demostrado en infecciones naturales y experimentales. Entre éstas se incluyen dos especies aparentemente adaptadas a este hospedador (*C. suis*, *C. scrofarum*), junto con otras de más amplia distribución como *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. meleagridis* o *C. muris* (Ryan y col., 2014). Entre las dos primeras se han descrito además diferencias en la edad de máxima receptividad, siendo *C. suis* más prevalente en cerdos jóvenes, mientras que *C. scrofarum* parece ser más frecuente en los adultos (Kvác y col., 2013). La receptividad de los cerdos a *C. parvum* permite deducir que esta especie animal podría desempeñar un papel potencial en la transmisión de esta zoonosis al hombre, aunque las escasas citas al respecto en la literatura especializada sugieren que este papel no es muy relevante (Ryan y col., 2014).

Los hallazgos del presente trabajo constituyen una nueva aportación a la casuística mencionada en el anterior párrafo y sustentarían el papel del cerdo como reservorio de especies zoonóticas de *Cryptosporidium*, ya que los dos aislados correctamente caracterizados fueron asignados a *C. parvum*, siendo además sus secuencias idénticas a aislados de referencia de origen bovino depositados en GenBank. Cabe destacar además la dificultad para poder caracterizarlos correctamente, ya que los repetidos intentos de amplificación en los trece aislados restantes resultaron infructuosos. Esta circunstancia estaría relacionada con la presencia de inhibidores o sustancias degradantes del ADN, aunque la adición de moléculas como Chelex100 al final del protocolo de extracción del ADN o albúmina sérica bovina en la mezcla de reacción de la PCR no proporcionaron un resultado positivo (Jex y col., 2008).

Por lo que respecta a la presencia de otros parásitos, destaca en primer lugar *Balantidium coli* como especie más prevalente, siendo identificado en todos los grupos de edad, pero más frecuentemente a partir de la fase de engorde. Este dato coincide con los hallazgos de numerosas publicaciones, donde se considera a *B. coli* como el parásito intestinal más frecuente en las explotaciones porcinas y se constata su comportamiento oportunista (Solaymani-Mohammadi y col., 2004; Weng y col., 2005; Schuster y Ramirez-Avila, 2008). Aunque la infección tiene habitualmente un curso subclínico, es importante recordar que *B. coli* se considera un protozoo emergente de carácter zoonótico incluido en la etiología de los que se viene denominando “Enfermedades olvidadas”, pudiendo ocasionar en individuos inmunocomprometidos

una infección fulminante con diarrea acuosa y con moco (Thompson y Smith, 2011; Szczotka y Pejsak, 2013).

Finalmente, cabe destacar la escasa presencia de otros parásitos como nematodos intestinales, hallazgo que se relaciona con la eficacia de los programas de desparasitación rutinarios con antihelmínticos que se llevan a cabo en las explotaciones donde se tomaron las muestras, así como la baja prevalencia de *Isospora suis*, cuya ausencia de las coprologías de lechones lactantes indica que el impacto de la coccidiosis porcina no parece relevante en la zona de estudio.

### 3.3 HUMANOS

Los resultados del estudio coprológico en población humana señalan a *Cryptosporidium* como uno de los parásitos intestinales más prevalentes en la zona geográfica investigada, que incluye la capital de Colombia y dos Departamentos del Suroccidente de Colombia. La infección fue diagnosticada en el 6,3% de los individuos, aunque la prevalencia estuvo relacionada con factores como el origen de las muestras (colegios *versus* hospitales) o la procedencia geográfica, en la que se incluían individuos de origen urbano (Bogotá, D.C) o rural (Nariño, Valle del Cauca). De hecho, el porcentaje de parasitación fue significativamente mayor en determinados grupos de población, como los niños procedentes de colegios (10,7%) o las muestras obtenidas en Nariño (12%) y Departamento del Valle del Cauca (12,5%). El incremento observado en el primer caso podría estar relacionado con la mayor receptividad de la población infantil a la infección por *Cryptosporidium*, mientras que la mayor prevalencia observada en pacientes del medio rural se podría relacionar con las peores condiciones sanitarias, así como el uso de fuentes de agua no potable o al menos de una calidad microbiológica inferior al agua que circula por la red de Bogotá, D.C (Bushen y col., 2007; Yáñez y Acevedo, 2013).

Los estudios previos publicados en Colombia arrojan valores de prevalencia de *Cryptosporidium* en humanos muy variables, fundamentalmente dependiendo del colectivo al que se ha dirigido la investigación, la zona geográfica o las técnicas utilizadas para realizar el diagnóstico. En niños inmunocompetentes, el porcentaje puede oscilar entre 4% y 32,3%, mientras que en niños inmunodeprimidos los valores oscilan entre 29% y 51,4% (Carreño y col., 2005; Siuffi y col., 2006). En la región

Sabana centro de Cundinamarca, Bayona y col. (2011) señalaron una prevalencia en población infantil de 7%, muy similar a la cifra registrada en nuestro estudio, mientras que, de Arango, y col. (2006) indican un porcentaje superior al 46% en niños de un hospital de Arauca. En la ciudad de Medellín, Navarro-I-Martinez y col. (2006) identifican este parásito en el 38,9% de 103 pacientes de 2 a 74 años, mientras que Flórez y col. (2003) lo encuentran en el 10,4% de 115 pacientes infectados por el VIH en la ciudad de Bogotá.

Un dato a destacar del presente trabajo es que más de la mitad de los individuos parasitados no estaban afectados con síntomas de diarrea y si bien se desconoce si habían presentado sintomatología en los días previos a la toma de muestras, este hallazgo revela un elevado porcentaje de eliminadores asintomáticos. Por otra parte, *Cryptosporidium* no estuvo acompañado de otros parásitos en la mayoría de pacientes infectados, salvo algunos casos donde coexistía con *Blastocystis* spp. o amebas. Esta misma observación se hizo extensiva a los restantes protozoos, ya que sólo en seis muestras se identificó la coexistencia de varios parásitos, pertenecientes a niños mayores de 5 años y en su mayoría obtenidas en colegios del departamento de Nariño.

Los estudios coprológicos revelan que los parásitos constituyen una de las causas más prevalentes de cuadros diarreicos en niños de 0 a 5 años en países en vías de desarrollo (26,7%), en comparación rotavirus (24,4%) o bacterias (17,6%) (Fall y col., 1989). En el presente trabajo no se investigó la presencia de microorganismos de naturaleza bacteriana o vírica, aunque el estudio coproparasitológico revela que casi la cuarta parte de la población estudiada (23,8%) era portadora de parásitos, siendo *Cryptosporidium* (9,1%) y *Giardia duodenalis* (7,5%) los más prevalentes, mientras que las amebas (complejo *E. histolytica* / *E. dispar*) parecen desempeñar un papel secundario (1,3%). Al igual que se observó en el caso de *Cryptosporidium*, la presencia de protozoos intestinales fue más frecuente entre los niños procedentes de colegios que en las muestras de origen hospitalario, así como en los de procedencia rural en comparación con los de origen urbano.

Las cifras registradas en nuestro estudio son inferiores a las obtenidas por Medina y col. (2009) en la ciudad de Medellín, donde evidenciaron que el 93% (54/58) de los niños que asistían a un comedor comunitario estaban parasitados por *G. duodenalis* (25,9%) y el complejo *E. histolytica*-*E. dispar* (46%). Por su parte, Luna y

col. (2010) realizaron un estudio transversal en los jardines infantiles aledaños a la cuenca baja del río Tunjuelito en Bogotá (92 niños de 2-5 años), donde detectan una prevalencia de parásitos intestinales inferior (17,4%), destacando *G. duodenalis* (7,6%), complejo *E. histolytica* / *E. dispar* (7,6%) y *A. lumbricoides* (2,2%). Estos investigadores señalan además cinco como las variables asociadas estadísticamente a la presencia de parásitos: contacto con el agua del río, estrato social y financiero, características del suelo de la vivienda, almacenamiento de basura y el hecho de caminar descalzo.

Una mención especial requiere el caso de *G. dudodenalis*, identificado como el segundo parásito más frecuente en nuestro trabajo (7,5%). Este valor es inferior al observado por Giraldo-Gómez y col. (2005) entre 328 niños que asistían a guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar familiar de Armenia, en el departamento de Quindío (13%), y mucho menor que el registrado tras el terremoto acontecido en esa ciudad unas años antes (1999), donde se identificó este protozoo en un 60,4% de los individuos, como consecuencia de las deficientes condiciones higiénico-sanitarias, el hacinamiento y el desabastecimiento de agua potable (Lora-suarez y col., 2002). Con referencia a *Blastocystis hominis*, las cifras descritas en Colombia oscilan entre 6,1% observado en población preescolar de guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar de esa misma ciudad de Armenia y 36,4% señalado en población infantil de 6 meses a 5 años en Calarcá, segunda ciudad del departamento de Quindío (Giraldo-Gómez y col., 2005; Londoño y col., 2009).

La distribución de las especies de *Cryptosporidium* en población humana no es uniforme, estando influenciada por factores geográficos, temporales o relacionados con el hospedador. Entre las especies más frecuentes en humanos en todo el mundo destacan *C. hominis*, con un patrón de transmisión eminentemente antroponótico y *C. parvum*, que infecta fundamentalmente artiodáctilos y humanos (Xiao, 2010; Ryan y col., 2014). En algunas zonas del planeta, la primera especie es más común en los asentamientos humanos más densamente poblados, mientras que *C. parvum* predomina en zonas rurales y áreas con alta densidad de ganado (Feltus y col., 2006; Zintl y col., 2009; Pollock y col., 2010). Una tercera especie, *C. meleagridis*, es un parásito primario de aves, aunque en algunos países tiene una prevalencia en humanos similar a *C. parvum* (Gatei y col., 2002; Cama y col., 2007).

El presente estudio constituye la primera aportación al conocimiento de la variabilidad interespecífica e intraespecífica de *Cryptosporidium* en humanos en Colombia, ya que la información disponible previamente, según la revisión bibliográfica, se limita a un estudio en la ciudad de Medellín sobre muestras de 103 pacientes de 2 a 74 años infectados por el VIH, donde se identifica la presencia de *C. hominis* (n: 3), *C. parvum* (n: 2) y *C. felis* (n: 1) (Navarro-I-Martinez y col., 2006). Nuestros hallazgos ponen de manifiesto el claro predominio de *C. parvum* frente a *C. hominis*. Esta segunda especie fue identificada en tan solo 4 de los 39 aislados correctamente caracterizados y en dos de éstos coexistía con *C. parvum*, circunstancia que confirmaría el escaso papel que desempeña en la epidemiología de la criptosporidiosis en la zona geográfica estudiada. Por el contrario, *C. parvum* fue identificada en los aislados restantes, procedentes tanto de individuos de origen urbano de la ciudad de Bogotá como de procedencia rural, en los departamentos del Valle del Cauca y Nariño.

La importancia del agua en el origen de los casos de criptosporidiosis no fue objeto de investigación en este trabajo, si bien se considera una de las principales vías de transmisión del parásito (Rosado-García, y col., 2017). De hecho, aunque como anteriormente se ha indicado no hay datos moleculares de *Cryptosporidium* spp. en humanos en Colombia, sí se dispone de información sobre su presencia en el agua de bebida. Concretamente, Rodríguez, y col. (2012) denunciaron su presencia habitual (64,5%) en el agua de suministro de 20 granjas de ganado vacuno lechero en el Departamento de Antioquía y un segundo estudio más reciente con muestras de agua de una planta potabilizadora de la región de Quindío reveló el predominio de *C. parvum* (21%) frente a *C. hominis* (10.5 %) (Triviño-Valencia y col., 2016).

Los resultados del estudio subgenotípico muestran la escasa diversidad genética de las cepas de *Cryptosporidium* de origen humano. La amplificación del locus GP60 y su posterior análisis mediante electroforesis capilar reveló que todos los aislados de *C. parvum* compartían el mismo alelo, identificado como subtipo IIaA15G2R1 mediante secuenciación de un grupo seleccionado de muestras. Esta misma circunstancia pudo constatar con los dos aislados de *C. hominis*, que compartían un alelo de 384pb identificado por secuenciación como IbA10G2R1. El subtipo IIaA15G2R1 se considera uno de los principales subtipos zoonóticos de *C. parvum* y la variante dominante en terneros en muchos países, aunque su presencia en humanos no implica necesariamente el origen zoonótico del contagio, ya que puede transmitirse de

persona a persona. Por su parte, el subtipo IbA10G2 está catalogado como una de las variantes más comunes de *C. hominis* en todo el mundo y su presencia indicaría transmisión antroponótica (Xiao, 2010; Ryan y col., 2014).

La amplificación de diversos microsatélites de *Cryptosporidium* tampoco aportó mucha información al estudio multilocus. Los alelos de la mayoría de marcadores no pudieron ser identificados porque no amplificaron correctamente, circunstancia que se relacionó con la mala calidad del ADN de partida, mientras que los dos marcadores que proporcionaron un fragmento de ADN del tamaño esperado (TP14, MSB) mostraron poca variabilidad. En el caso de *C. parvum*, la mayoría de aislados expresaron el mismo alelo en ambos locus, motivo por el cual únicamente se identificaron tres subtipos multilocus (MLTs) en esta especie, todos los cuales estaban relacionados por variantes de un solo locus con el algoritmo eBURST. La diversidad fue mayor en el caso de *C. hominis*, ya que ambos aislados diferían en el alelo identificado en ambos microsatélites y fueron asignados a diferentes MLTs, aunque el escaso número analizado justifica la necesidad de estudios futuros con mayor número de muestras y en otras zonas de Colombia.

La diversidad genética también fue investigada entre los aislados de *G. duodenalis*, utilizando en este caso una técnica multilocus basada en la amplificación de tres loci (*tpi*, *bg*, *ssu-rRNA*). Esta técnica permitió asignar correctamente la mayoría de los aislados (20/23) a los ensamblajes B (n: 11) y A (n: 9), pudiendo clasificarse la mayoría de estos últimos como sub-ensamblaje AII (7/9). Ambos ensamblajes son las variantes potencialmente zoonóticas de *G. duodenalis* y pueden identificarse tanto en humanos como en animales, aunque parecen tener preferencia por determinados hospedadores, de forma que tanto el ensamblaje B como el sub-ensamblaje AII estarían más restringidos al ser humano, mientras que el sub-ensamblaje AI está asociado más frecuentemente con diversas especies animales. Si tenemos en cuenta esta circunstancia, podemos concluir que el patrón de transmisión del parásito en la zona geográfica objeto de nuestra investigación es preferentemente antroponótico. Ninguno de los otros seis ensamblajes reconocidos de este parásito (C a H) fueron identificados, lo cual coincide con su elevada especificidad de hospedador y de hecho hasta el momento no se ha demostrado que infecten al ser humano (Ryan y Cacciò, 2013).



El mapa de distribución de ensamblajes de *G. duodenalis* en humanos no mantiene un patrón uniforme. En Sudamérica, el ensamblaje A ha sido identificado como más prevalente en determinados países como México o Brasil (Eligio-García, y col., 2008; Kohli y col., 2008), mientras que en Nicaragua o Argentina predomina el ensamblaje B (Lebbad y col., 2008; Minvielle y col., 2008), observación que puede hacerse extensiva al caso de Colombia. El estudio de Ramírez y col. (2015) en zonas rurales del departamento de Cundinamarca, situado en el centro del país, señala un claro predominio del ensamblaje B (90%) frente al A (10%), con una mayor presencia a su vez de la variante zoonótica AI frente a la AII. A conclusión similar llegaron Arroyo-Salgado y col. (2014) en la provincia noroccidental de Bolívar, donde de nuevo se observa el predominio del ensamblaje B (92,3%). Por el contrario, el estudio de Rodríguez y col. (2014) en el también central departamento del Tolima concluye que la distribución de los ensamblajes A (48%) y B (52%) mantiene proporciones similares.

Este apartado del trabajo de investigación constituye el primer estudio subgenotípico de *Cryptosporidium* en población humana en Colombia, utilizando un panel con diversos microsatélites y minisatélites, junto con el locus GP60. Los hallazgos más relevantes confirman el predominio de *C. parvum* sobre *C. hominis* y la escasa variabilidad genética de ambas especies, y demuestran la importancia de realizar estudios similares en otras zonas geográficas del país. Es asimismo destacable el estudio molecular de las cepas de *G. duodenalis*, que sugiere un patrón de transmisión eminentemente antroponótico.



**OBJETIVO 2. EVALUAR LA  
UTILIDAD DE PÉPTIDOS  
SINTÉTICOS DE *Cryptosporidium  
parvum* EN LA INMUNIZACIÓN  
FRENTA A LA  
CRIPTOSPORIDIOSIS**

---



# **1 MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 1.1 SELECCIÓN Y SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS

Este apartado del estudio se realizó en colaboración con el Núcleo de Biotecnología de Curauma de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile). Los péptidos seleccionados para realizar la síntesis fueron derivados de tres proteínas de *C. parvum*: P23, CP15 y CSI y su diseño fue realizado en base a las siguientes secuencias depositadas en GenBank:

- P23: AAN08817.1, AAN08816.1, AAN08815.1, AAN08814.1, AAN08813.1 y AAN08812.1 (Sturbaum y col., 2003).
- CP15: ABO61338.1, ABO61337.1, ABO61336.1 (Jenkins y Fayer, 1995; Mi y col., 2007).
- CSL: XP\_626798.1 y EAK89265.1 (Abrahamsen y col., 2004).

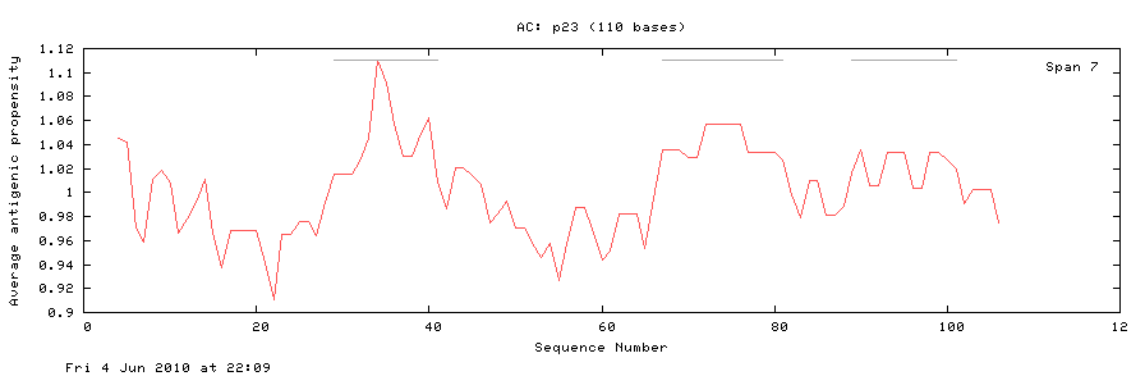
Inicialmente, se realizó la alineación de cada proteína con ClustalW, determinando a continuación las regiones conservadas mediante el software CLC Main Workbench 5.0 (CLC bioUSA, Cambridge, MA, USA) (Figuras 35, 37 y 39). Finalmente, se definieron los péptidos de acuerdo con su afinidad antigénica con el software Predicted Antigenic Peptides de la Universidad Complutense de Madrid (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) (Figuras 36, 38 y 40; Tablas 38, 39 y 40). En la predicción para seleccionar las regiones potencialmente antigénicas se tomó como punto de corte un promedio superior a 1.0 (eje x).

Con los resultados de la predicción se determinaron los péptidos a sintetizar, teniendo en cuenta además su accesibilidad a los solventes (hidrofilicidad) y su estructura (en lo posible, que no fuera sólo helical). Con el fin de evitar N-glicosilaciones, los péptidos que en su inicio tenían treonina o serina fueron descartados. Asimismo, se descartaron los péptidos que en su secuencia tenían cisteína para evitar la formación de polímeros. Una vez analizados todos los datos, se seleccionaron finalmente para su síntesis química un total de 7 péptidos derivados de las proteínas P23, CP15 y CSL de *C. parvum* cuyas características se señalan en la Tabla 41.

Figura 35 Alineamiento de la proteína P23



Figura 36 Predicción de la afinidad antigénica de la proteína P23



(el eje x indica la posición del aminoácido en proteína analizada)

Tabla 38 Determinantes antigénicos analizados en la proteína P23

No.	Posición de inicio	Secuencia	Posición final
1	29	EKKAQLAKAVKNP	41
2	67	AADAPAAQAPAAPAE	81
3	89	ADAPAAEAPAAEP	101



Figura 37 Alineamiento de la proteína CSL

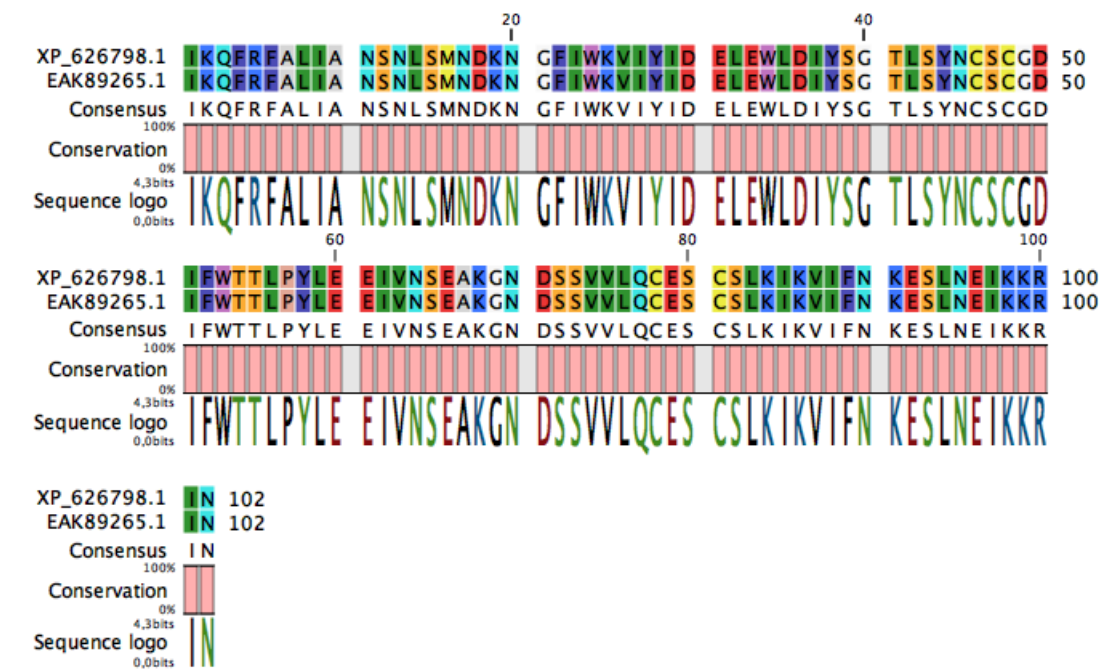
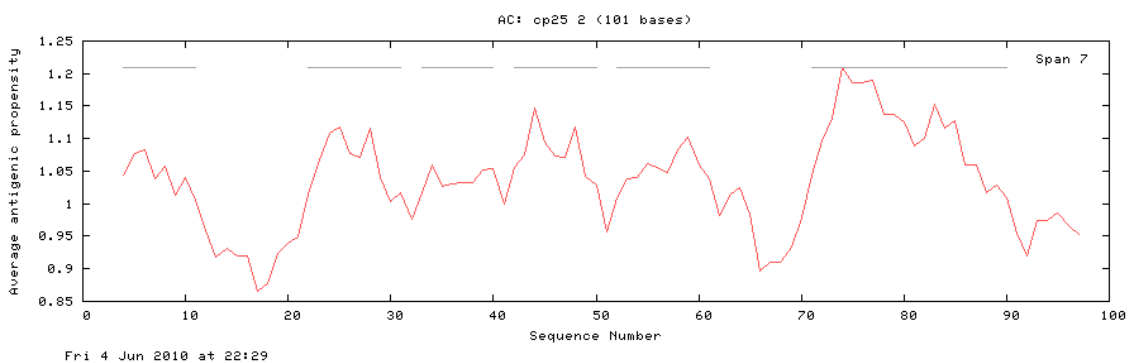


Figura 38 Predicción de la afinidad antigénica de la proteína CSL



(el eje x indica la posición del aminoácido en proteína analizada)

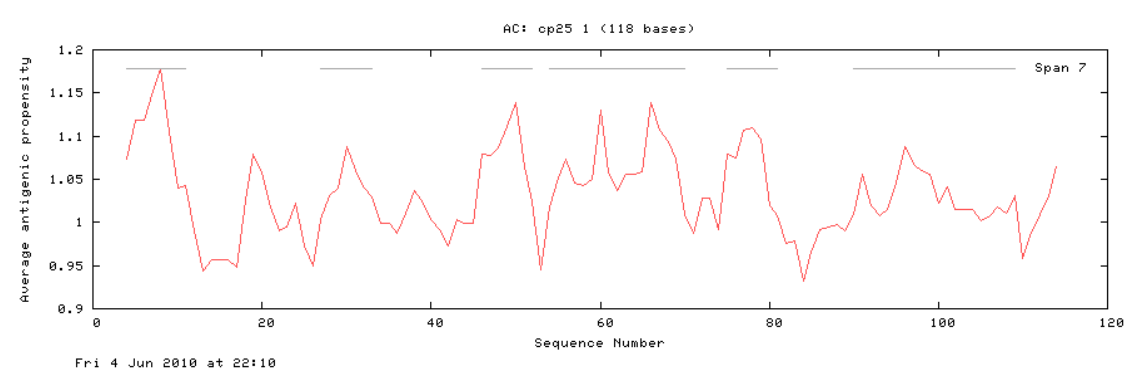
Tabla 39 Determinantes antigénicos analizados en la proteína CSL

No.	Posición de inicio	Secuencia	Posición final
1	4	FRFALIAN	11
2	22	FIWKVIYIDE	31
3	33	EWLDIYSG	40
4	42	LSYNCSGCD	50
5	52	FWTTLPYLEE	61
6	71	DSSVVLQCESCSLKIKVIFN	90

Figura 39 Alineamiento de la proteína CP15



Figura 40 Predicción de la afinidad antigénica de la proteína CP15



(el eje x indica la posición del aminoácido en proteína analizada)

Tabla 40 Determinantes antigénicos analizados en la proteína CP15

No.	Posición de inicio	Secuencia	Posición final
1	4	DEVVELLP	11
2	27	TAAFI AK	33
3	46	KPVAVRT	52
4	54	LRNMVILPEMVG S VAGV	70
5	75	TYVTVEI	81
6	90	LGEFSITYKPVRHGKPGVGS	109

Tabla 41 Descripción de los péptidos seleccionados para el presente trabajo

Proteína	Posición inicio <sup>1</sup>	Secuencia	Posición final <sup>2</sup>	Peso molecular (Daltons)	No. Aa <sup>3</sup>
<b>P23-1</b>	29	EKKAQLAKAVKNP	41	1424.69	13
<b>P23-2</b>	67	AADAPAAQAPAAPAE	81	1321.43	15
<b>CP15-1</b>	44	GEKPVAVRTHLRNMVILPE	62	2159.59	19
<b>CP15-2</b>	54	LRNMVILPEMVGSVAGVA	71	1785.2	18
<b>CP15-3</b>	90	LGEFSTYKPVRRHGKPGVGS	109	2129.45	19
<b>CSL-1</b>	17	NDKNGFIWKVIYIDLEWLD	36	2510.82	19
<b>CSL-2</b>	71	DSSVVLQCESCCLKIKVIFN	90	2212.62	19

<sup>1,2</sup>Posición de inicio y fin en la proteína correspondiente, <sup>3</sup>Aa: aminoácidos

Las secuencias de los siete péptidos seleccionados fueron enviadas para su síntesis química en la Universidad Católica de Valparaíso (Chile) mediante el sistema de múltiples péptidos en fase sólida, utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (Pista de resina 0,65 meq/g; IRIS Biotech). Los péptidos se hidrolizaron con TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95%/2,5%/2,5%) y purificaron mediante RP-HPLC, su pureza y peso molecular fueron confirmados por MALDI-TOF, tras lo cual fueron liofilizados (Merrifield, 1963; Houghten, 1985; Guzmán y col., 2007).

Adicionalmente y con el fin de conocer la estructura secundaria de los péptidos sintetizados se realizó dicroísmo circular (Greenfield, 2006), registrando el espectro a 20°C con un espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a un sistema Peltier PFD-425S para el control de la temperatura. Para este procedimiento se diluyó el péptido a razón de 0,1 mg/ml en diferentes porcentajes de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) (Roccatano y col., 2002). Los espectros se analizaron de 195 a 260 nm utilizando una celda de cuarzo de 1 mm (Bethke y col., 2012). Junto con los péptidos seleccionados, en la Universidad Católica de Valparaíso también fue sintetizado el inmuoestimulador FISEAIIHVLHSR (conocido como FIS).

Una vez sintetizados y liofilizados, los péptidos y el inmuoestimulador fueron remitidos a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Ciencias Aplicadas y

Ambientales (U.D.C.A) de Bogotá (Colombia) para realizar los ensayos en ratones, tal como se describe en el apartado siguiente.

## 1.2 DINÁMICA DE ANTICUERPOS FRENTE A LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS EN RATONES

Este apartado del estudio fue realizado en los laboratorios de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A). En el mismo se usaron 90 ratones hembra destetadas de aproximadamente 3 semanas de edad, de raza Albina Suiza (ICR), adquiridos en el bioterio de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Los ratones se distribuyeron en nueve grupos de 10 ratones, siete de los cuales fueron utilizados para evaluar los péptidos y dos grupos control, uno de los cuales fue tratado con el adyuvante sin péptido (adyuvante de Freund SIGMA - F5881 y F5506) y un segundo al que no se realizó ninguna inoculación (Tabla 42).

**Tabla 42: Grupos de ratones para evaluar la dinámica de anticuerpos producidos frente a diferentes péptidos**

Nº Grupo *	Péptido
761	P23-1 + adyuvante + inmunomodulador
762	P23-2 + adyuvante + inmunomodulador
764	CP15-1 + adyuvante + inmunomodulador
765	CP15-2 + adyuvante + inmunomodulador
766	CP15-3 + adyuvante + inmunomodulador
767	CSL-1 + adyuvante + inmunomodulador
768	CSL-2 + adyuvante + inmunomodulador
Control Adyuvante	Adyuvante sin péptido
Control	Sin ningún tratamiento

\* Cada grupo estaba formado por 10 individuos.

La dosis de formulación para cada ratón estaba constituida por 25 µg del péptido liofilizado y 25 µg de inmunoestimulador (FIS) resuspendidos en 50 µl de solución salina estéril 0,9%. La suspensión fue mezclada con 50 µl de adyuvante completo o

incompleto de Freund de acuerdo con el protocolo de inoculación (primera dosis con adyuvante completo, dosis posteriores con adyuvante incompleto). La esterilidad de las formulaciones así preparadas fue evaluada incubando placas de agar sangre y MacConkey en atmósferas de anaerobiosis y aerobiosis, a 37°C durante 72 y 48 horas respectivamente.

Los ratones fueron mantenidos conforme a lo indicado en la Ley 84 de 1989, la Resolución 8430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud de Colombia (Congreso Nacional de Colombia, 1989; Ministerio de Salud de Colombia, 1993) y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio octava edición (2011) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) (National Research Council of the National Academies, 2011). También se tuvo en cuenta lo estipulado por la Asociación Americana Médica Veterinaria (AVMA) en el panel de Eutanasia en Junio de 2007 (Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association, 2007). El estudio fue avalado por el Acta No. 17 del Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A reglamentado bajo el Acuerdo No. 285 de 2008 en su capítulo VII (Anexo 1).

Las disposiciones relativas a diferentes aspectos de este estudio con animales de experimentación fueron las siguientes:

**Transporte:** los ratones fueron transportados en cajas especiales, realizando un periodo de aclimatación de 48 horas tras su llegada al centro para reducir el estrés del transporte.

**Alojamiento:** los ratones fueron mantenidos durante el ensayo en cajas de 20 x 30 x 12 cm. En cada caja se alojaron 10 ratones con una cama de viruta esterilizada previamente, la cual fue reemplazada 2 veces por semana para mantener bajos los niveles de amoníaco.

**Alimentación:** la cantidad diaria de pienso suministrado a cada caja fue de unos 80 gramos, teniendo en cuenta la ingesta diaria/ratón (4 – 5 gr) y la cantidad que cae a la cama y se desperdicia. El agua también fue renovada diariamente, utilizando un biberón que se rellenaba con 100 ml. de agua potable.

Procedimiento: los ratones fueron pesados para calcular la dosis de anestesia requerida y la cantidad de sangre que se le podía extraer a cada uno. El peso promedio de los ratones era de 15 gr. en el momento de realizar la primera extracción de sangre. De acuerdo a este peso, cada ratón recibió por vía inhalatoria 0,5 ml de Isoflurano®, lo que equivale a una dosis del 3% (Plumb, 2005).

Eutanasia: cumpliendo la normativa vigente, al terminar el ensayo, los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico inhalado (Isoflurano®).

Disposición de residuos: los cadáveres de los ratones fueron dispuestos en bolsas rojas para su posterior incineración. Los residuos generados durante la investigación se desecharon de acuerdo con las normas de la Universidad U.D.C.A.

### **1.2.1 Protocolo de inoculación**

Una vez transcurrido el tiempo de aclimatación tras su llegada a los laboratorios de la U.D.C.A, los ratones fueron anestesiados y sangrados mediante punción cardiaca con jeringas para insulina BD Ultra-Fine® de calibre 31G 5/16. Esta primera extracción de sangre se llevó a cabo para verificar, mediante ELISA, que los ratones no tuviesen anticuerpos frente a los péptidos sintetizados. Una vez confirmado este extremo, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea en el lomo con 100 µl de la formulación (50 µl péptido-FIS + 50 µl adyuvante completo de Freund). Las inoculaciones en cada ratón fueron repetidas cuatro veces más, con intervalos de 7 días, también por vía subcutánea en el lomo con 100 µl de la formulación (50 µl péptido-FIS + 50 µl adyuvante incompleto de Freund). En total cada ratón de los siete grupos tratados recibió cinco inoculaciones (días 0, 7, 14, 21 y 28). Las inoculaciones en un grupo adicional de ratones se realizaron con adyuvante sin péptido y un último grupo no recibió ningún tratamiento.

Para evaluar la dinámica de los anticuerpos, los ratones fueron sangrados antes de cada inoculación y finalmente sacrificados ocho días después de la última (día 35). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos y el suero obtenido depositado en viales y congelado a -20°C hasta su uso. Tras la necropsia también se tomaron muestras de piel, riñón e hígado, las cuales fueron enviadas al laboratorio de Patología de la U.D.C.A. para evaluar posibles daños ocasionados por el adyuvante o el péptido.

### 1.2.2 Detección de anticuerpos

La presencia de anticuerpos frente a los diferentes péptidos en las muestras de sangre fue investigada mediante una técnica ELISA según el protocolo descrito por Lorenzo y col. (1993). Para ello, se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos que fueron antigenadas depositando en cada pocillo 100 µl de una solución constituida por 0,6 µl de péptido diluido en tampón carbonatado 0,1M pH 9,6. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda para fijar el antígeno, realizando posteriormente tres lavados de 5 minutos con 200 µl de PBS 0,04M pH 7,2. A continuación, se adicionó a cada pocillo 200 µl de una solución bloqueante con 200 µl de tampón carbonatado pH 9,6 en suero equino 1%, realizando posteriormente 3 lavados de 5 minutos con un tampón de lavado, constituido por Tween 20 0.05% en PBS.

A cada pocillo se adicionó una alícuota de 100 µl del suero problema diluido 1:20 en PBS pH 7.2 con suero equino 1% y azida de sodio 0,02%, seguido de una incubación a 37°C durante 1 hora en cámara húmeda y 3 lavados de 5 minutos con tampón de lavado. Posteriormente se adicionó a cada pocillo 100 µl del conjugado (anti-IgG de ratón con fosfatasa alcalina) a una dilución 1:2000 (Sigma A2429), seguido de una incubación a 37°C durante 1 hora y 3 lavados de 5 minutos con solución de lavado. Finalmente, se adicionó a cada pocillo 100 µl del sustrato cromógeno (*p*-nitrofenilfosfato), con una incubación de 2 horas a temperatura ambiente por 2h.

La hidrólisis de la enzima del sustrato se detuvo con NaOH 2M y la lectura de las absorbancias se realizó a una densidad óptica de 405 nm con un lector para microplacas Biorad®. Cada muestra fue analizada por duplicado y por triplicado en caso del control negativo. Las absorbancias superiores a la media de la absorbancia del control negativo más tres desviaciones estándar fueron consideradas como positivas.

### 1.2.3 Análisis estadístico

Con el fin de evaluar la relación entre los diferentes tratamientos y los hallazgos patológicos observados en las muestras de tejidos y haciendo uso del programa SPSS

(IBM Corp, 2012), se calcularon las frecuencias y la fuerza de asociación entre las variables. Adicionalmente, haciendo uso de la calculadora epidemiológica del Servicio Vasco de Tecnologías Sanitarias ([https://www.fisterra.com/mbe/investiga/5nnt/calc\\_epidemiologica.xls](https://www.fisterra.com/mbe/investiga/5nnt/calc_epidemiologica.xls)) se calculó el riesgo relativo (RR), el porcentaje de reducción del riesgo relativo (RRR) y la reducción de riesgo absoluto (RRA). Para conocer la correlación existente entre las variables binomiales y las cuantitativas, se halló el coeficiente de correlación biserial puntual (rbp).

### **1.3 PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACIÓN “*in vitro*”**

Con base a los resultados y sueros obtenidos en el apartado anterior y con el objetivo de evaluar la capacidad de seroneutralización de los anticuerpos producidos frente a cada péptido, se seleccionaron los cuatro péptidos que estimularon en mayor medida la producción de anticuerpos, concretamente los derivados de las proteínas CSL (CSL-1, CSL-2) y CP15 (CP15-1, CP15-3). Estos péptidos fueron sintetizados por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y utilizados para inmunizar nuevos grupos de ratones adquiridos en el bioterio de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Los ensayos fueron realizados en la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

#### **1.3.1 Protocolo de inoculación**

En este apartado se utilizaron 63 ratones albinos suizos, que fueron distribuidos en 9 grupos de 7 animales tal como se indica en la Tabla 43. Cuatro grupos fueron inoculados con el correspondiente péptido en adyuvante y otros cuatro con el péptido en solución salina 0.9%, con el fin de descartar el péptido como la causa de daños tisulares observados en el ensayo anterior. Un grupo adicional no inoculado fue utilizado como control. En estos ensayos se utilizaron también los sueros de ratones inoculados con el péptido más inmunoestimulador (FIS) y adyuvante obtenidos del ensayo anterior sobre dinámica de anticuerpos (Tabla 42).

Los ratones de cada grupo, con excepción del grupo control, fueron inoculados cuatro veces (días 0, 14, 21 y 28 de la experiencia). Las inoculaciones se realizaron



por vía subcutánea en el lomo, utilizando 100 µl de la suspensión preparada con adyuvante completo (primera dosis) o incompleto (dosis siguientes) de Freund o bien NaCl 0,9% según se indica en la Tabla 43. Una semana después de recibir la última dosis (día 35), todos los ratones fueron sacrificados con Isoflurano® como se describe en el apartado anterior, realizando a continuación la extracción de sangre mediante punción cardíaca y obtención del suero sanguíneo.

**Tabla 43: Grupos de ratones para evaluar la capacidad de seroneutralización de anticuerpos producidos frente a diferentes péptidos**

Nº grupo	Péptido
764	CP15-1 + adyuvante
766	CP15-3 + adyuvante
767	CSL-1 + adyuvante
768	CSL-2 + adyuvante
764	CP15-1 + NaCl 0,9%
766	CP15-3 + NaCl 0,9%
767	CSL-1 + NaCl 0,9%
768	CSL-2 + NaCl 0,9%
Control	Sin ningún tratamiento

\* Cada grupo estaba formado por 7 individuos

Con base en los resultados del ensayo anterior y con el objetivo de descartar al péptido como posible inductor de lesiones, tras el sacrificio se realizó una radiografía a todos los animales para buscar alteraciones en las articulaciones y se tomaron muestras de piel (punto de inoculación), riñón y rodilla, que fueron enviadas al laboratorio de Patología de la U.D.C.A. El hígado fue excluido en esta toma de muestras porque en el ensayo anterior no se observaron daños significativos en este órgano.

Una alícuota de todos los sueros fue utilizada para determinar el título de anticuerpos mediante la técnica ELISA descrita en el apartado anterior. Una segunda alícuota fue remitida a los laboratorios del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, Agricultural Research Services, Washington, USA), donde se realizaron las pruebas de seroneutralización tal como se describen más adelante. Los sueros utilizados correspondieron a los obtenidos tras inocular los ratones con las

diferentes formulaciones: 1) péptido + FIS + adyuvante; 2) péptido + adyuvante; 3) péptido + NaCl 0.9%. Los sueros fueron analizados por grupo y no por individuo, para lo cual en un vial se mezclaron 10 µl de suero de cada individuo del grupo. Estas pruebas se llevaron a cabo bajo la supervisión del Dr. Mark Jenkins utilizando protocolos previamente descritos (Upton y col., 1995; Eckert y col., 2003).

### 1.3.2 Cultivo de *C. parvum*

Las pruebas de seroneutralización se realizaron en cultivos *in vitro* de la cepa de *Cryptosporidium parvum* Iowa, en línea celular HTC-8 (células de adenocarcinoma humano ATCC No. CCL-244, Manassas, Va). Para ello, alícuotas de  $1 \times 10^4$  ooquistes de *C. parvum* fueron resuspendidas en hipoclorito sódico 2,6% durante 10 minutos, en hielo, realizando posteriormente 3 lavados con PBS frío (para evitar el desenquistamiento) (Jenkins y col., 2000). Posteriormente, los ooquistes así tratados fueron incubados a 37°C durante 24 horas a con los sueros anti-péptido producidos en los ratones frente a cada péptido en una dilución 1:10.

Una concentración inicial de  $50 \times 10^5$  células/ml de células HCT-8 fue sembrada en placas de 96 pocillos en medio esencial mínimo Dubelco, adicionado con suero fetal bovino (10%) y Tween 20 (0.1%) para evitar uniones inespecíficas de los esporozoítos. Los cultivos fueron posteriormente incubados durante 48 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> (Jenkins y col., 2002). Cuando la monocapa de la línea celular de HCT-8 fue confluyente, los cultivos fueron infectados con las suspensiones ooquisticas tratadas con los diferentes sueros e incubados durante 1 hora a 37°C.

### 1.3.3 PCR semicuantitativa

Tras la incubación se realizó un tratamiento de los cultivos con tripsina para eliminar los esporozoítos que no infectaron las células, realizando posteriormente lavados con solución de Hanks antes de recolectarlas. Posteriormente, haciendo uso de un kit comercial de Qiagen (DNeasy Blood and Tissue Kit) se realizó extracción del ADN de las células cultivadas, cuantificando la cantidad obtenida (ng/µl) mediante espectofotómetro en una longitud de onda de 230 nm. Tras estimar la cantidad de ADN se depositaron 20 µl de cada muestra en el gel de agarosa.

En la técnica de PCR se amplificó un fragmento de una proteína ribosomal de *Cryptosporidium* (CP11) utilizando una técnica descrita por Jenkins y col. (1997; 1998; 2002). Brevemente, para la preparación de la mezcla se tomaron 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U Taq polimerasa (Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland), 0.2 mM de los dNTPs, y 1 µl de cada cebador (P5 y P6) para un volumen total de 50 µl. La amplificación se produjo en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos por 30 ciclos, seguido de una extensión final a 72°C durante 7 minutos, realizando posteriormente una electroforesis en gel de poliacrilamida con el producto amplificado de cada ensayo.

En los ensayos donde *C. parvum* habían infectado las células se observaron dos bandas de ~570 pb y ~410 pb, en donde la banda más alta corresponde al ADN de la proteína del parásito y la más baja a la molécula competidora de la CP11, cuya presencia asegura que un resultado negativo de la PCR no obedece a la presencia de inhibidores. Se consideró que los anticuerpos anti-péptido eran neutralizantes cuando se observó únicamente la banda de ~410 pb, circunstancia indicativa de la capacidad de los anticuerpos para bloquear la infección de las células HCT-8 por parte de los esporozoítos de *C. parvum*.



## **2 RESULTADOS**

---



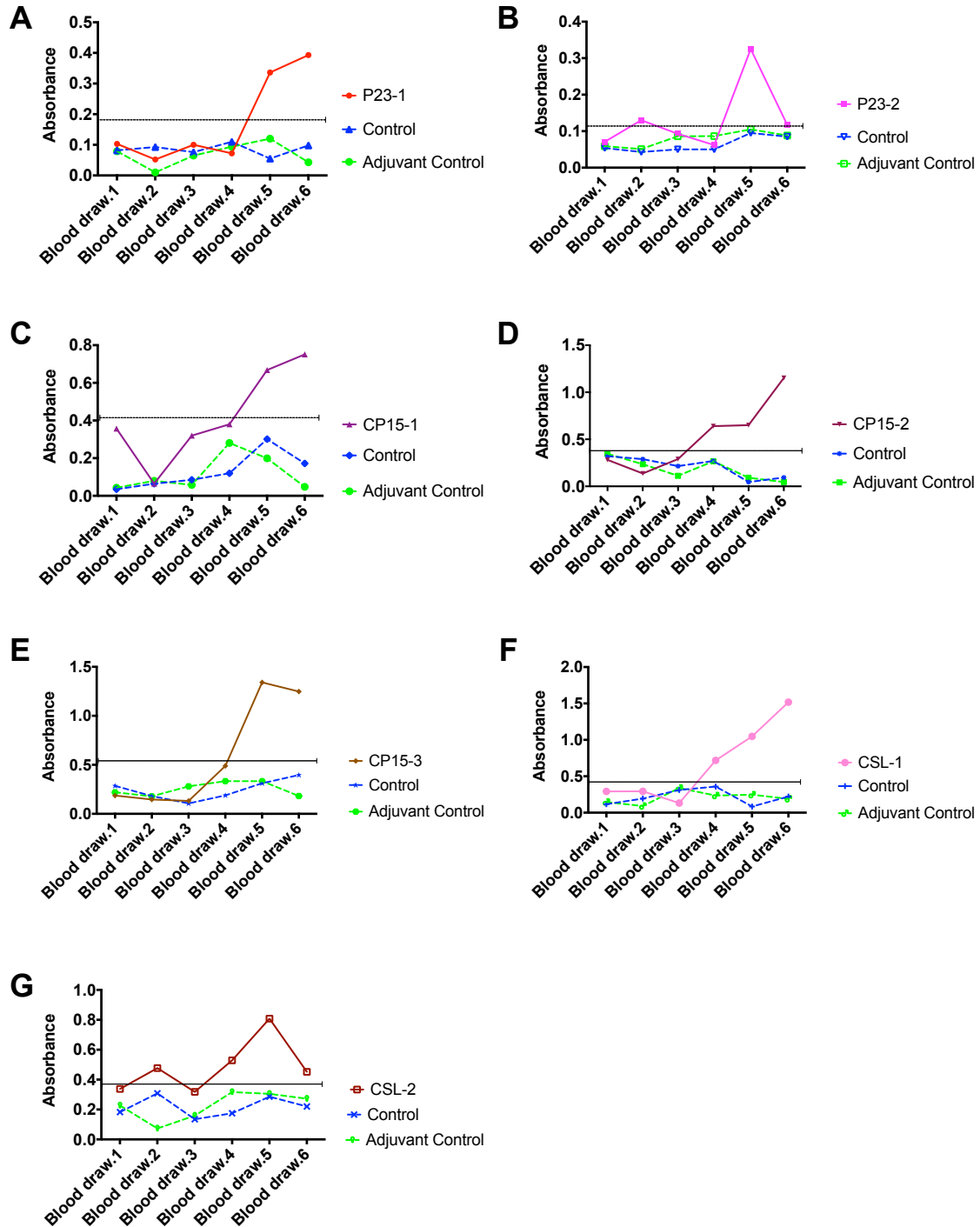
## **2.1 DINÁMICA DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A PÉPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS CP15, CSL Y P23 DE *C. parvum***

En los siete grupos de ratones inoculados con los diferentes péptidos con adyuvante e inmunoestimulante (FIS) que aparecen en la Tabla 42 se observó la producción de anticuerpos anti-péptidos. Por el contrario, los individuos de los grupos control resultaron negativos en las pruebas de ELISA, mostrando absorbancias inferiores a la media de los controles negativos más dos desviaciones estándar. Las mejores respuestas se observaron en los animales tratados con los péptidos CP15-1 (grupo 764), CP15-3 (grupo 766), CSL-1 (grupo 767) y CSL-2 (grupo 768). La dinámica de absorbancias, así como los porcentajes de positividad para cada péptido se observan en las Figuras 41 y 42.

En los grupos de ratones utilizados para las pruebas de seroneutralización que aparecen en la Tabla 43, también se comprobó que la formulación con los péptidos CP15-1 (grupo 764), CP15-3 (grupo 766), CSL-1 (grupo 767) y CSL-2 (grupo 768) sin FIS pero con adyuvante tuvieron la capacidad de estimular la producción de anticuerpos en al menos 2 de los animales tratados (Figura 43). En estas mismas pruebas se observó que los valores de las absorbancias de los sueros de los animales inoculados con las formulaciones de esos mismos péptidos en solución salina (sin FIS y sin adyuvante) estuvieron por debajo del punto de corte, con excepción de un animal inoculado con el péptido CP15-3 (grupo 766).

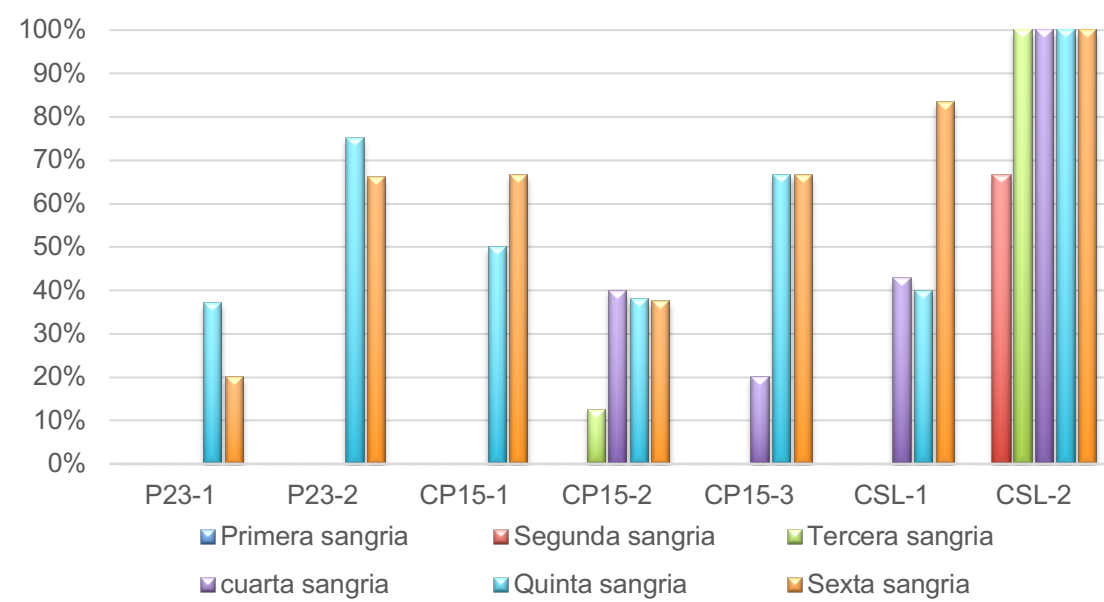
De las anteriores observaciones se puede deducir que la adición de FIS y adyuvante estimuló la producción de anticuerpos en todos los grupos tratados con el péptido. Una respuesta similar fue observada cuando en el inóculo se eliminó el FIS, con producción de anticuerpos en todos los grupos, aunque el número de individuos positivos fue en este caso menor. Finalmente, sólo un individuo resultó positivo cuando en el inóculo se eliminó tanto el FIS como el adyuvante.

**Figura 41 Absorbancias** obtenidas en cada uno de los grupos tratados con la formulación a base de péptido más FIS y adyuvante de Freund. A. Péptido P23-1 (grupo 761), B. Péptido P23-2 (grupo 762); C. Péptido CP15-1 (grupo 764); D. Péptido CP15-2 (grupo 765); E. Péptido CP15-3 (grupo 767); F. Péptido CSL-1 (grupo 768); G. Péptido CSL-2 (grupo 769)

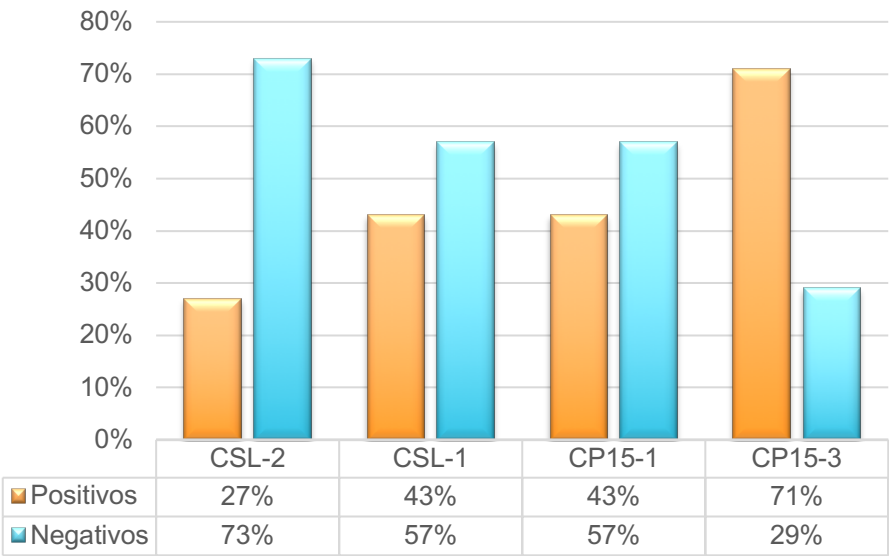




**Figura 42** Porcentajes de ratones con título positivo para cada uno de los grupos inoculados con diferentes péptidos más FIS y adyuvante



**Figura 43** Porcentaje de ratones con título positivo para cada uno de los grupos inoculados con los diferentes péptidos con adyuvante, pero sin FIS como inmunoestimulante. Resultados en muestras de suero obtenidas tras el sacrificio de los ratones

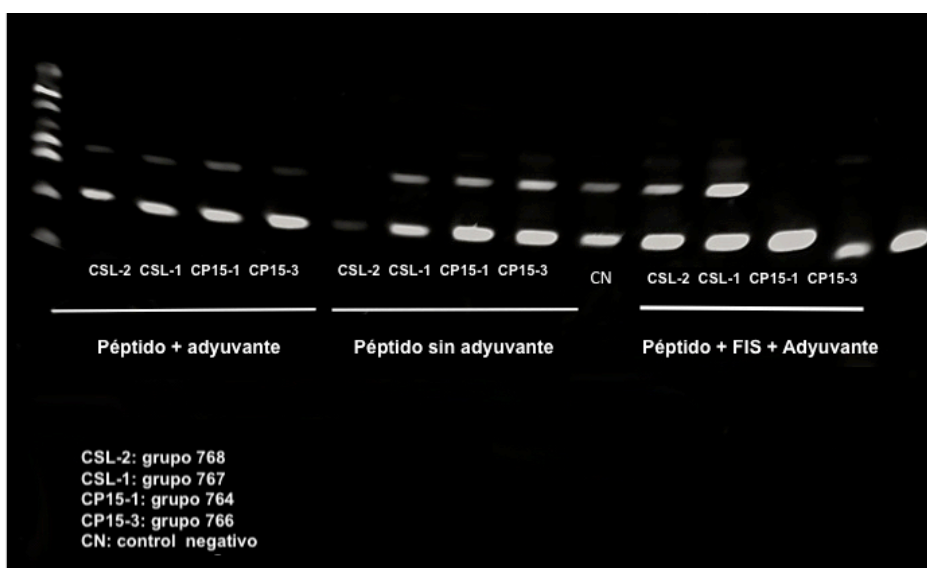


## 2.2 CAPACIDAD DE SERONEUTRALIZACIÓN *in vitro* DE LOS ANTICUERPOS

El resultado de las pruebas de seroneutralización realizadas con los sueros de los diferentes grupos de ratones que se recogen en las Tablas 42 y 43 revelaron que los anticuerpos estimulados por los péptidos en la mayoría de grupos de ratones no tenían la capacidad de neutralizar el ingreso de *Cryptosporidium* en las células cultivadas. Dicha circunstancia fue puesta en evidencia por la presencia de dos bandas de 570 pb y 410 pb tras la amplificación por PCR del extracto de ADN de los cultivos celulares, tanto en los grupos inoculados con los diferentes péptidos (CSL-1, CSL-2, CP15-1, CP15-3) formulados con adyuvante y sin inmunestimulante o en los grupos inoculados en ausencia de ambos.

Por el contrario, en dos de los grupos inoculados con una formulación que incluía adyuvante e inmunestimulante, concretamente con los péptidos CP15-1 y CP15-3 se observó la ausencia de la banda de 570pb correspondiente al ADN de la proteína del parásito, hallazgo indicativo de la capacidad de los anticuerpos para bloquear la infección de las células HCT-8 por parte de los esporozoítos de *C. parvum* (Figura 44).

**Figura 44 Pruebas de seroneutralización *in vitro* con anticuerpos obtenidos en ratones inoculados con diversos péptidos sintéticos de *Cryptosporidium parvum* en presencia o ausencia de adyuvante y/o inmunestimulante. Resultados de la PCR**



## 2.3 EFECTOS ADVERSOS

### 2.3.1 Piel

En los ratones inoculados con los diferentes péptidos en presencia de FIS y adyuvante se observaron lesiones macroscópicas a partir de la tercera inoculación, con inflamación en el punto de inyección y en ocasiones ulceración de la piel (Figura 45). Histopatológicamente en la piel de estos ratones se observó dermatitis mixta caracterizada por un infiltrado inflamatorio en la dermis profunda con predominio de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y en menor proporción mononucleares, así como zonas de necrosis, edema y congestión. La lesión se acompañaba de dilatación de las glándulas sudoríparas ecrinas y formación quística en dermis (Figura 46). Estas lesiones fueron graves en un tercio de los individuos, especialmente en ratones inoculados con algún péptido derivado de las proteínas CP15 o CSL.

En la piel de todos los ratones inoculados con péptido y adyuvante en ausencia de FIS se observó reacción inflamatoria grave o muy grave caracterizada por infiltrado de leucocitos mononucleares macrófagos y en menor proporción polimorfonucleares neutrófilos, formación de células gigantes multinucleadas compatibles con células tipo Langerhans y formaciones quísticas. Estas lesiones se observaron principalmente en dermis profunda, panículo y músculo.

Las lesiones en piel en los grupos de ratones inoculados con los diversos péptidos en ausencia de adyuvante o FIS fueron muy poco frecuentes, observando un solo individuo con infiltrado inflamatorio leve y predominio de leucocitos mononucleares en dermis superficial. En los animales inoculados con el adyuvante se observó infiltrado inflamatorio de moderado a grave en la dermis profunda, con predominio de polimorfonucleares neutrófilos, mononucleares en menor proporción y zonas de necrosis, edema y congestión. Esta lesión estuvo acompañada de la dilatación de las glándulas sudoríparas ecrinas con formación quística en dermis. Finalmente, no se observaron cambios macro- o microscópicos en la piel de los ratones del grupo control (Tabla 44).

Al evaluar la relación entre la lesión en la piel (independiente del tipo de tratamiento) y la seroconversión, se encontró una relación entre las variables ( $P < 0,001$ ,  $\chi^2$ ), de modo que los ratones que seroconvirtieron tuvieron el 88% más de

probabilidades de presentar lesiones moderadas, graves o muy graves en piel (RR; 1,65 IC 95% 1,29 – 2,10; OR:7,33 IC 95% 2,35 – 22,91). El coeficiente de correlación biserial indicó que el daño en el sitio de inoculación observado como la formación de un foco inflamatorio local se asocia a la positividad (rbp-0,71). Sin embargo, cuando se examinó lo ocurrido con los ratones de grupo tratado con el péptido más adyuvante y FIS frente a los animales tratados con el péptido y sólo adyuvante se encontró una probabilidad del 85,7% de observar daños moderados, graves o muy graves en la piel en aquellos animales en los cuales no se usó FIS como inmunoestimulante ( $P < 0,05$ ,  $\chi^2$ ). Todo ello sugiere que el FIS se comporta como un factor protector, reduciendo la gravedad de la lesión (RR 1,17 IC 95% 1,01 - 1,35; OR: 6 IC 95% 0,72 – 50,02).

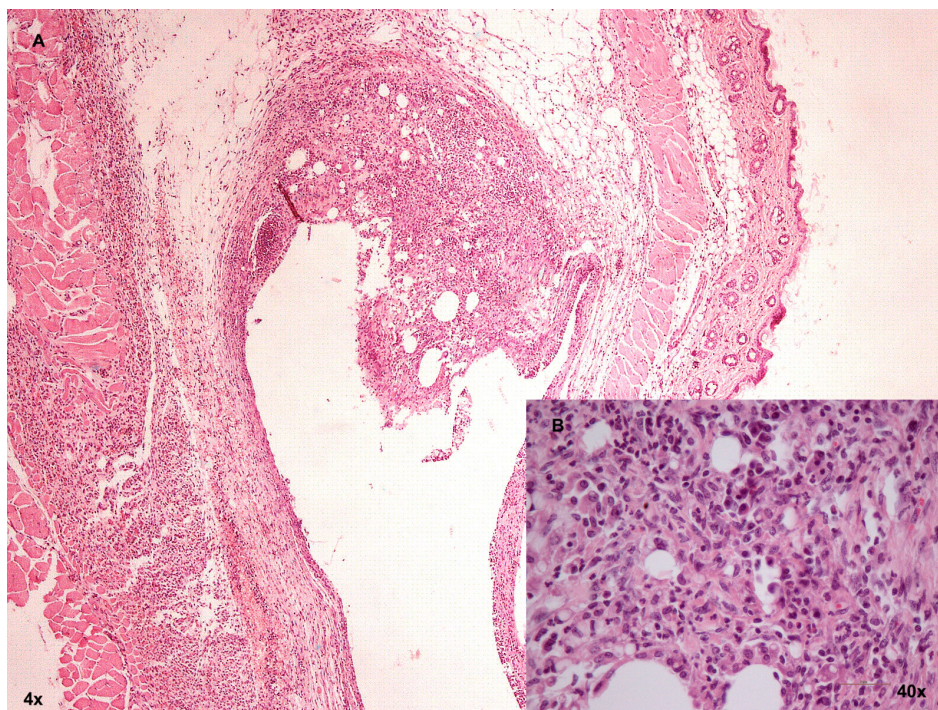
**Figura 45** Inflamación postinoculación observada en la piel de un ratón inoculado con un péptido sintético de *Cryptosporidium parvum*



**Tabla 44: Porcentaje de ratones con diferentes grados de lesión en la piel. Grupos inoculados con diferentes péptidos de *C. parvum* en presencia/ausencia de FIS y/o adyuvante**

Grupo	Normal	Muy leve	Leve	Moderado	Grave	Muy grave
P23-1+FIS+adyuvante	0%	14%	14%	57%	14%	0%
P23-2+FIS+adyuvante	17%	0%	50%	17%	17%	0%
CP15-1+FIS+adyuvante	0%	0%	17%	0%	67%	17%
CP15-2+FIS+adyuvante	0%	0%	0%	25%	25%	50%
CP15-3+FIS+adyuvante	0%	0%	0%	0%	71%	29%
CSL-1+FIS+adyuvante	0%	0%	0%	0%	71%	29%
CSL-2+FIS+adyuvante	0%	13%	0%	13%	63%	13%
CP15-1+adyuvante (no FIS)	0%	0%	0%	0%	57%	43%
CP15-3+adyuvante (no FIS)	0%	0%	0%	0%	50%	50%
CSL-1+adyuvante (no FIS)	0%	0%	0%	14%	43%	43%
CSL-2+adyuvante (no FIS)	0%	0%	0%	0%	57%	43%
CP15-1 (no FIS o adyuvante)	100%	0%	0%	0%	0%	0%
CP15-3 (no FIS o adyuvante)	100%	0%	0%	0%	0%	0%
CSL-1 (no FIS o adyuvante)	100%	0%	0%	0%	0%	0%
CSL-2 (no FIS o adyuvante)	86%	0%	14%	0%	0%	0%
Control Adyuvante	0%	0%	0%	75%	25%	0%
<b>Total</b>	<b>25%</b>	<b>2%</b>	<b>6%</b>	<b>11%</b>	<b>36%</b>	<b>21%</b>

**Figura 46 Lesiones observadas en la piel de ratones inoculados con diferentes péptidos sintéticos de *C. parvum*. A y B. Infiltrado inflamatorio grave con predominio de leucocitos PMN neutrófilos y formación quística en dermis bajo aumento de 4x y 40x, respectivamente**



### 2.3.2 Riñón

En el 24% de los ratones se evidenció una nefritis intersticial leve con focos de infiltrado inflamatorio con predominio de mononucleares linfocitarios de localización perivascular (Tabla 45 y Figura 47). El coeficiente de correlación biserial puntual indicó que el daño renal está asociado con la positividad de los animales (rbp -0,48). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se encontró relación significativa entre los diferentes tratamientos y el infiltrado inflamatorio observado en el riñón. Al comparar los hallazgos histopatológicos del riñón con los ratones del grupo control, se comprueba que los algunos grupos de ratones inoculados con péptidos en presencia de FIS y adyuvante (CSL-1, CSL-2, CP15-1) tuvieron tres veces más riesgo de padecer nefritis intersticial, mientras que el riesgo se duplica en los inoculados con los péptidos CP15-2 y CP15-3 (RR: 2). Por el contrario, los ratones inoculados con la proteína P23 no presentaron infiltrado inflamatorio en el riñón. Las lesiones renales podrían estar relacionadas con el uso de adyuvante de Freund, tal como describe

Greaves (2000). Al igual que lo observado en las lesiones cutáneas, el daño renal estuvo asociado con la seroconversión en los ratones.

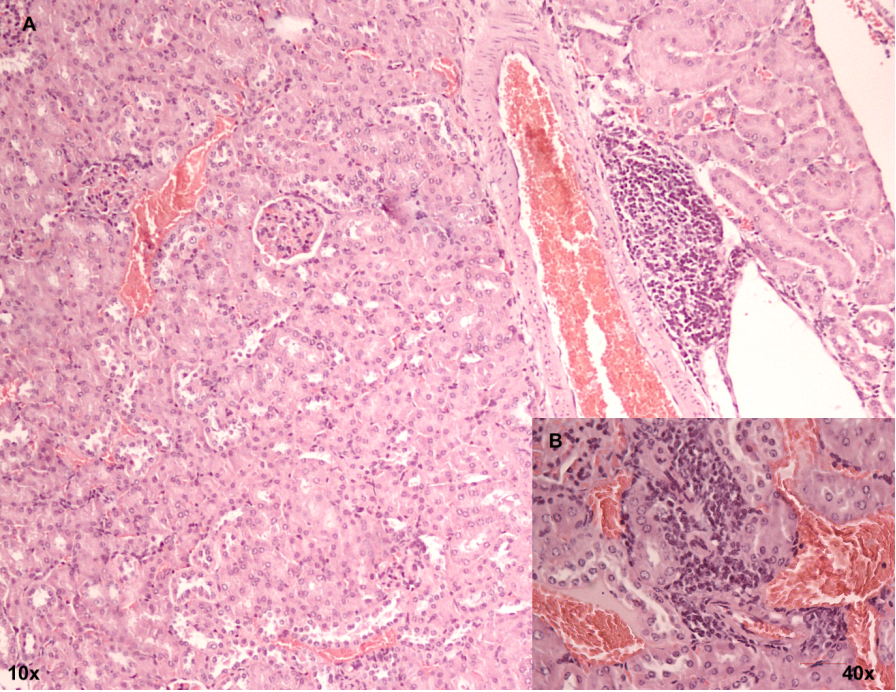
Algunos de los ratones (16/62) inoculados con los péptidos CSL-2, CSL-1, CP15-1, CP15-3 sin inmunoestimulador presentaron daño leve o moderado en el riñón, caracterizado por un infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial asociado a la médula. Ocho de estos ratones habían sido inoculados con péptido + adyuvante, aunque la relación no fue estadísticamente significativa (Figura 48).

**Tabla 45 Porcentaje de ratones con diferentes grados de nefritis (leve/moderada). Grupos inoculados con diferentes péptidos de *C. parvum* en presencia/ausencia de FIS y/o adyuvante**

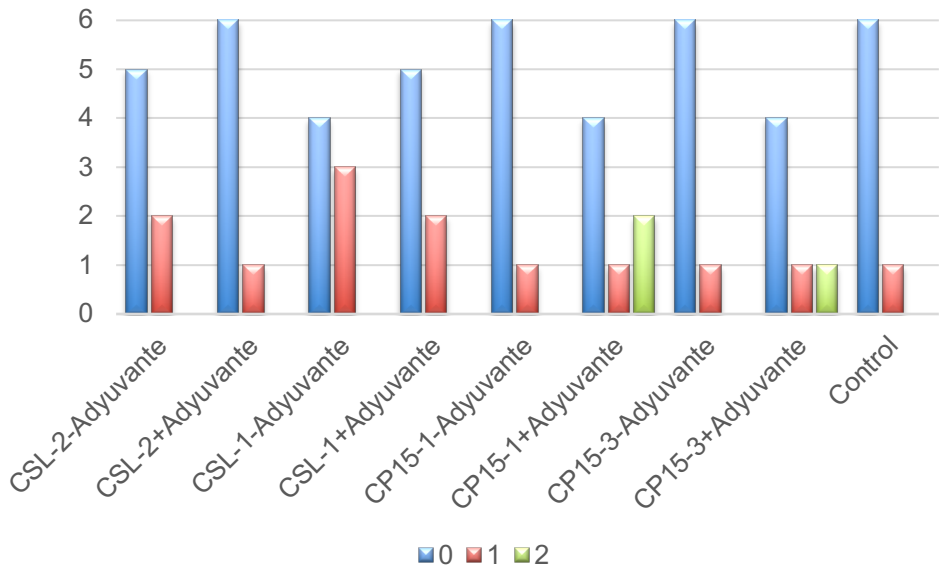
Grupo	Normal	Leve	Moderada
P23-1+FIS+adyuvante	100%	0%	0%
P23-2+FIS+adyuvante	100%	0%	0%
CP15-1+FIS+adyuvante	67%	33%	0%
CP15-1 (no FIS o adyuvante)	86%	14%	0%
CP15-1+adyuvante (no FIS)	57%	14%	29%
CP15-2+FIS+adyuvante	75%	25%	0%
CP15-3+FIS+adyuvante	71%	29%	0%
CP15-3 (no FIS o adyuvante)	83%	17%	0%
CP15-3+adyuvante (no FIS)	0%	75%	25%
CSL-1+FIS+adyuvante	71%	29%	0%
CSL-1 (no FIS o adyuvante)	57%	43%	0%
CSL-1+adyuvante (no FIS)	71%	29%	0%
CSL-2+FIS+adyuvante	63%	25%	13%
CSL-2 (no FIS o adyuvante)	71%	29%	0%
CSL-2+adyuvante (no FIS)	86%	14%	0%
Control	75%	25%	0%
Control Adyuvante	67%	33%	0%
<b>Total</b>	<b>72%</b>	<b>24%</b>	<b>4%</b>



**Figura 47 Lesiones observadas en el riñón de ratones inoculados con diferentes péptidos sintéticos de *C. parvum*. A y B. Focos de infiltrado inflamatorio mononuclear en intersticio con predominio perivascular bajo aumento de 10× y 40×, respectivamente**



**Figura 48 Número de animales que presentaron infiltrado inflamatorio mononuclear en el riñón. 0: ausencia de cambios. 1: infiltrado leve. 2: infiltrado moderado**

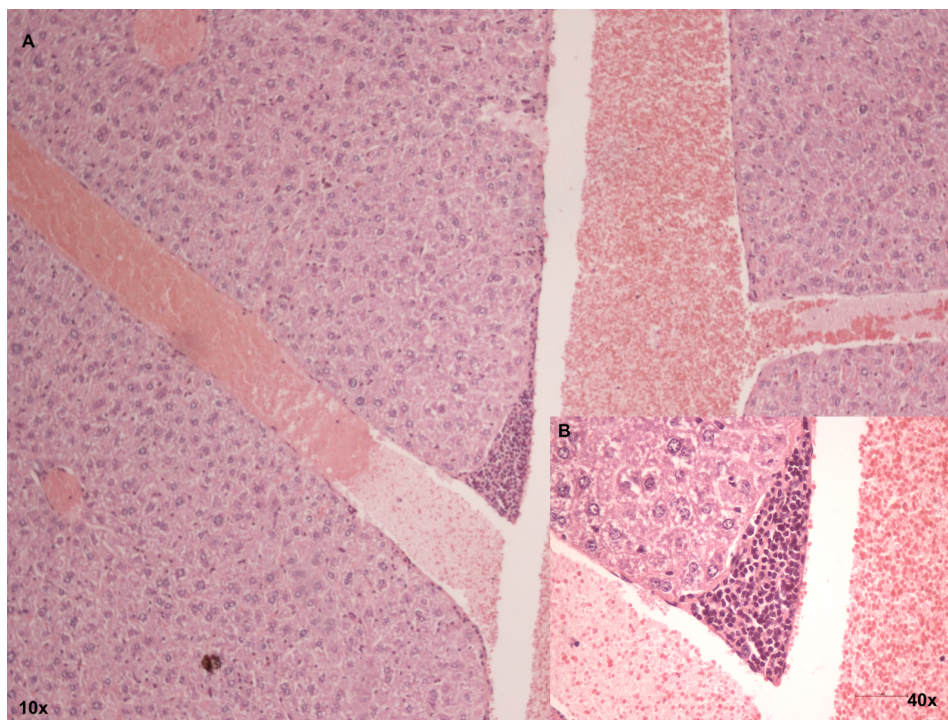




### 2.3.3 Hígado

La presencia de lesiones hepáticas fue poco evidente en los diferentes grupos de ratones, siendo únicamente destacable la presencia de focos inflamatorios en casi la mitad de los ratones inoculados con el péptido CP15-3, caracterizado por ser el que inducía una respuesta de anticuerpos más intensa; es así como el coeficiente de correlación biserial indicó que el infiltrado inflamatorio en el hígado se asocia a la positividad de los ratones (rbp -0,305) (Figura 49 y Tabla 46). Sin embargo, al comparar todos los grupos en conjunto y realizar el análisis estadístico, no se encontró una relación estadísticamente significativa entre el péptido utilizado y la presentación de los focos inflamatorios.

**Figura 49 Lesiones observadas en el hígado de ratones inoculados con diferentes péptidos sintéticos de *C. parvum*. A y B. Se observan focos de infiltrado inflamatorio leve bajo aumento de 10× y 40×, respectivamente.**



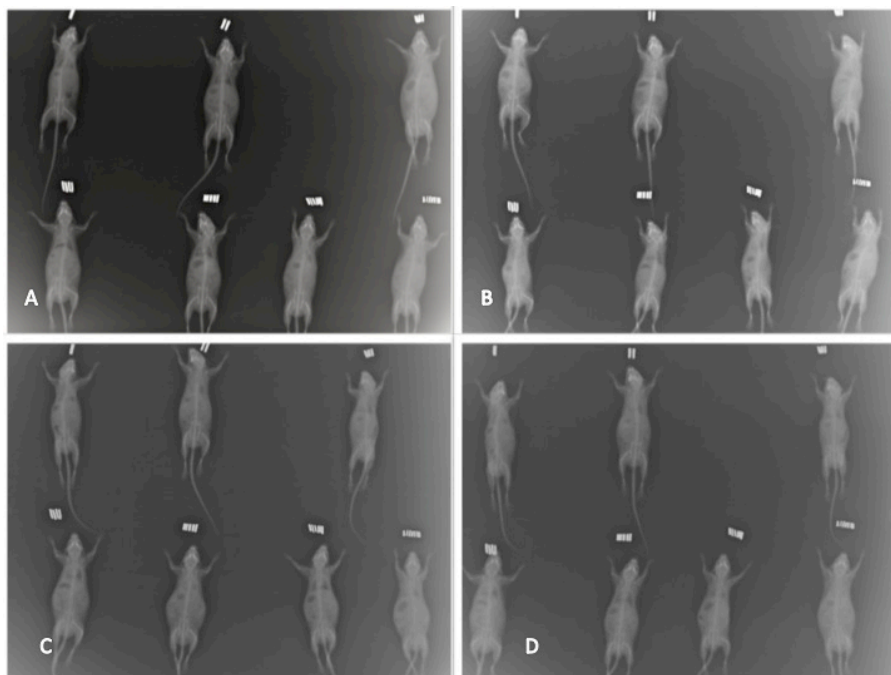
**Tabla 46: Porcentaje de ratones con algún tipo de lesión en hígado. Grupos inoculados con diferentes péptidos de *C. parvum* en presencia de FIS y adyuvante**

Grupo	No	Si
P23-1	90%	10%
P23-2	100%	0%
CP15-1	100%	0%
CP15-2	100%	0%
CP15-3	60%	40%
CSL-1	80%	20%
CSL-2	100%	0%
Control	100%	0%
Control Adyuvante	90%	10%
<b>Total</b>	<b>91%</b>	<b>9%</b>

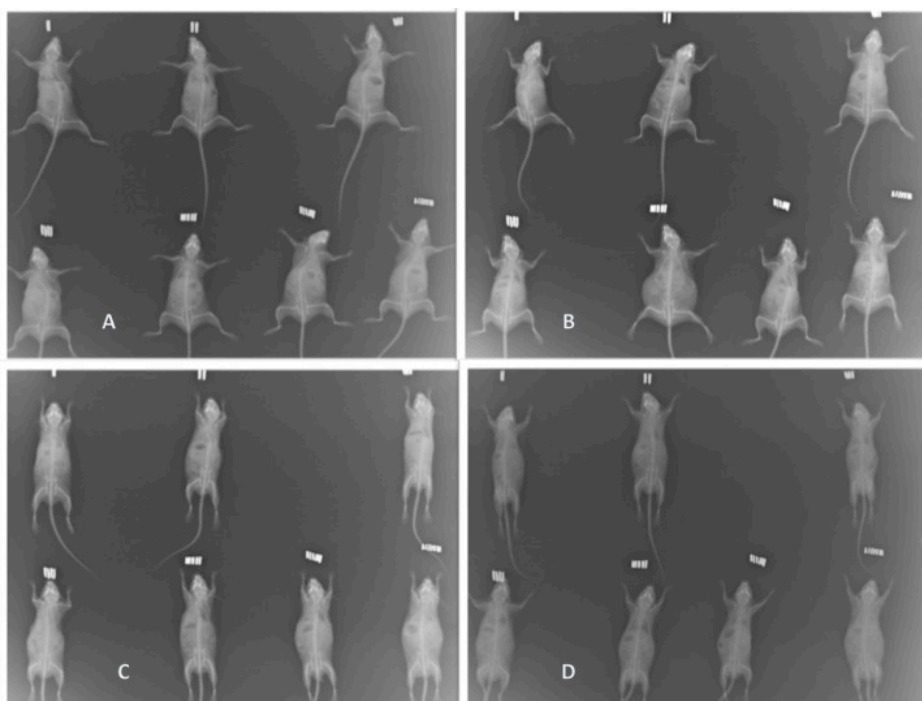
#### 2.3.4 Rayos x

El estudio radiológico en los grupos de ratones inoculados con los péptidos que aparecen en la Tabla 43 no mostró signos de artritis ni evidencia de otras alteraciones en las estructuras óseas de ninguno de los animales (Figuras 50 y 51).

**Figura 50 Radiografía de los ratones inoculados con la formulación del péptido + solución salina 0.9% (A. CSL-2. B. CSL-1. C. CP15-1. D. CP15-3)**



**Figura 51 Radiografía de los ratones inoculados con la formulación del péptido + adyuvante de Freund (A. CSL-2. B. CSL-1. C. CP15-1. D. CP15-3)**





## **3 DISCUSIÓN**

---



La criptosporidiosis es una parasitosis para la que actualmente todavía no se ha desarrollado una terapia realmente eficaz, a pesar de los enormes esfuerzos que la comunidad científica ha realizado durante los últimos años con la evaluación de cientos de agentes quimioterapéuticos, tanto en modelos experimentales como en animales infectados de forma natural. En este contexto, la inmunopprofilaxis ha adquirido una enorme trascendencia, bien como forma de prevenir la infección o al menos para reducir su gravedad o la duración del cuadro clínico (Mead, 2014).

El desarrollo de vacunas ha sido una de las contribuciones más importantes de la inmunología a la medicina y a la salud pública en la historia de la medicina (Amon y Ben-Yedidia., 2003). En el caso de la criptosporidiosis y aparte de su interés veterinario, dos serían los grupos de población principalmente beneficiados por una vacuna eficaz. Por una parte, los individuos infectados por el VIH en países en vías de desarrollo, donde no se tiene acceso a la denominada “terapia antiretroviral altamente activa” (highly-active anti-retroviral therapy (HAART), cuyo empleo permite una reducción considerable de las infecciones oportunistas en estos pacientes. En segundo lugar, los niños menores de 5 años de estos mismos países, en los que la criptosporidiosis se incluye entre las cuatro causas más frecuentes de diarrea y situaciones crónicas de malnutrición que pueden desencadenar la muerte (Guerrant y col., 1999; Kotloff y col., 2013).

Una de las primeras estrategias para el diseño de vacunas pasa por la investigación de los antígenos diana para los anticuerpos protectores. En este sentido, son numerosos los antígenos de *Cryptosporidium* identificados en los estadios que participan en la adhesión y penetración en las células hospedadoras, bien como proteínas de superficie o formando parte del complejo apical. Los sueros de animales infectados reconocen diversos antígenos inmunodominantes de esporozoítos, incluyendo péptidos de aproximadamente 11, 15, 23, 44, 100, 180 y >200. Entre éstos se incluyen los antígenos de superficie CSL, Cp900, Cp23/27, Cp40/45, Cp15/17, Muc4 y Muc5. Los anticuerpos desarrollados frente a algunos de estos antígenos tienen eficacia terapéutica en modelos de animales de experimentación (Boulter-Bitzer y col., 2007).

Entre los péptidos que han despertado mayor interés destacan los denominados Cp40/15 y Cp23/27. El primero, expresado como precursor de la glucoproteína GP60, es capaz de estimular la producción de interferón-gamma por parte de las células mononucleares de la sangre y también de anticuerpos IgA que reducen la duración de la enfermedad, según se ha demostrado en niños en Bangladesh (O'Connor y col., 2007; Preidis y col., 2007; Wanyiri y col., 2007; Allison y col., 2011). El péptido Cp23 es una proteína de superficie expresada en los estadios invasivos del parásito. Los estudios en animales indican que los plásmidos portadores del mismo promueven la activación de anticuerpos y de células CD4, reduciendo la carga parasitaria, además de inducir un estado de inmunidad de larga duración cuando se administra de forma repetida (Ehigiator y col., 2007; Borad y col., 2012; Checkley y col., 2015).

En el presente trabajo de investigación se utilizó un modelo murino para evaluar la capacidad inmunogénica de diversos péptidos sintetizados químicamente a partir de secuencias derivadas de proteínas de *Cryptosporidium*, así como el carácter neutralizante de los anticuerpos producidos frente a ellos. Todos los péptidos analizados estimularon la producción de anticuerpos, aunque no todos los anticuerpos producidos fueron capaces de neutralizar el ingreso del parásito en las células. Aunque la predicción *in silico* mostraba a los péptidos como candidatos, los ensayos en los ratones confirmaron que las regiones conservadas de algunas proteínas son inmunológicamente silentes o pobremente inmunogénicas (Patarroyo y col., 2008; Curtidor y col., 2015, 2017).

En este sentido, y de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios con otros protozoos como *Plasmodium falciparum*, las secuencias de aminoácidos útiles para llevar a cabo funciones biológicas críticas son altamente conservadas y visibles al sistema inmune, pero inmunológicamente silentes como consecuencia de la particular estructura tridimensional que adoptan. Asimismo se ha demostrado que las regiones conservadas de muchas estructuras funcionalmente relevantes, involucradas en la invasión, están estratégicamente localizadas lejos de regiones altamente polimórficas e inmunogénicas, con el fin de distraer al sistema inmune (Curtidor y col., 2017).

En este estudio se comprueba que todos los péptidos sintéticos seleccionados estimularon la seroconversión en al menos 37% de los ratones cuando eran inoculados con inmunoestimulante. No obstante, fueron cuatro los péptidos que



proporcionaron una respuesta más intensa: CP15-1 (grupo 764), CP15-3 (grupo 766), CSL-1 (grupo 767) y CSL-2 (grupo 768) y de ellos, sólo los dos primeros generaron anticuerpos neutralizantes, capaces de inhibir la penetración del parásito en el interior de las células. Para el caso de grupos inoculados con péptidos en ausencia de inmunoestimulante (FIS), los péptidos que mostraron mayor capacidad de estimular la producción de anticuerpos fueron de nuevo y por este orden: CP15-3 (grupo 766), CSL-1 (grupo 767) y CP15-1 (grupo 764).

Aunque el suero de algunos ratones inoculados con el péptido en presencia adyuvante pero sin FIS mostró absorbancias que superaron el punto de corte, los valores nunca fueron tan elevados como en los grupos inoculados con el péptido más FIS y adyuvante. Este hallazgo sugiere que las regiones conservadas son poco inmunogénicas y que el inmunoestimulante FIS estimula la producción de IL-4, favoreciendo así la producción de anticuerpos (López-Díaz de Cerio y col., 2003). De hecho y con alguna rara excepción, ninguno de los ratones inmunizados con péptidos en ausencia de adyuvante produjo anticuerpos detectables con la prueba de ELISA.

En la búsqueda de candidatos a vacunas para el control de la criptosporidiosis se han realizado diversos ensayos previos con las proteínas CP15 y P23. No obstante, los resultados obtenidos han sido contradictorios, ya que en algunos casos se concluye su capacidad para estimular la respuesta inmune tipo Th1 y Th2 y en otros sólo la primera de ellas (Bonafonte y col., 2000; Benitez y col., 2009; Liu y col., 2010). El carácter intracelular de *Cryptosporidium* hace que estimule en mayor proporción la inmunidad celular, aunque el diseño de vacunas debe estar también dirigido a la producción de anticuerpos que bloqueen las regiones críticas que utiliza el parásito para adherirse y penetrar en las células, enfoque básico de las vacunas sintéticas.

Además de los ensayos *in vitro* o en modelos experimentales, con estas mismas proteínas se han realizado ensayos vacunando a las madres para obtener calostro hiperinmune. Este es el caso de una plásmido recombinante que codifica para la proteína CP15, que resultó incapaz de prevenir la infección en cabritos que recibieron calostro de las madres vacunadas con el mismo, aunque tanto la gravedad de los síntomas como la eliminación ooquistica fueron inferiores a las observadas en los animales testigo (Jenkins y col., 1998; Sagodira y col., 1999). Un análisis global de estas observaciones y de los hallazgos del presente trabajo indica que si bien la proteína CP15 desempeña un papel relevante en la unión del esporozoíto a los

enterocitos, el bloqueo completo requeriría una vacuna con múltiples epítomos que representen las partes funcionales más relevantes, al igual que se recomienda en otras enfermedades parasitarias como la malaria (Patarroyo y col., 2008).

La viabilidad de una vacuna también está relacionada con el efecto adverso que puede llegar a ocasionar en el individuo. Por esta razón, en este estudio también se evaluaron los posibles hallazgos patológicos a nivel renal, hepático y dérmico. Las lesiones dérmicas observadas en el punto de inoculación eran esperadas y estarían asociadas a las reacciones adversas que ocasionan la mayoría de adyuvantes parenterales en el sitio de inoculación, siendo la más común la sensibilidad local e hinchazón, mientras que las reacciones más graves implican la formación de abscesos dolorosos, que en el presente estudio no fueron observados (Batista-Duharte y col., 2011).

Los adyuvantes completo e incompleto de Freund están basados en emulsiones de agua en aceite, las cuales tienen la capacidad de estimular la inmunidad humoral y celular (Chang y col., 1998). Sin embargo, su uso en vacunas para humanos se encuentra muy restringido debido a su toxicidad, que puede causar inflamación crónica e inducir complicaciones autoinmunes (Alexander y Brewer, 1995). La relación de la positividad con la formación de un foco inflamatorio concuerda con lo indicado por Batista-Duharte y col. (2011), quienes mencionan que el daño en los tejidos tras una inoculación puede estar generado no sólo por el adyuvante, sino también por la respuesta inmune generada frente al mismo péptido. No obstante, en nuestro estudio no se observaron lesiones en el punto de inoculación en los ratones tratados con el péptido sin inmunoestimulante (FIS) y sin adyuvante.

Los ratones tratados con el péptido acompañado de FIS y adyuvante desarrollaron lesiones cutáneas con predominio de neutrófilos, mientras que, en las lesiones de los ratones tratados con el péptido sin FIS, pero con adyuvante predominaban los macrófagos. Este hallazgo pudo deberse a la producción de IFN-gamma e interleucina IL-4 como consecuencia del uso de FIS. Ambas citoquinas tienen efecto antagónico, ya que mientras el primero estimula la proliferación de macrófagos e inhibe la proliferación de neutrófilos, la IL-4 inhibe la proliferación de macrófagos y estimula una proliferación de neutrófilos que en nuestro caso terminó prevaleciendo (Snoeck y col., 1993). Por otra parte, el adyuvante de Freund estimula

la liberación de IFN-gamma, favoreciendo la presentación de macrófagos en la región (Stills, 2005).

El análisis global de los hallazgos del estudio histopatológico permite deducir que los péptidos por sí solos no ocasionaron problemas aparentes a los animales y que las lesiones observadas en los tejidos de algunos animales estarían relacionadas fundamentalmente con el uso del adyuvante, circunstancia que aconseja la evaluación de moléculas alternativas para estimular la inmunogenicidad de los péptidos en futuras investigaciones.



## **CONCLUSIONES**

---



**Primera.** El estudio coprológico en terneros lactantes revela que la infección por *Cryptosporidium* está ampliamente distribuida en las explotaciones de ganado vacuno del centro de Colombia. El parásito se identifica en todos los grupos de edad, aunque es especialmente prevalente en la segunda semana de vida y su presencia incrementa significativamente el riesgo de que los terneros padezcan diarrea, lo que permite considerarlo un enteropatógeno muy relevante en esta zona geográfica.

**Segunda.** *Cryptosporidium parvum* es la especie responsable de la mayoría de casos de criptosporidiosis en terneros lactantes. El polimorfismo del gen *gp60* evidencia numerosos subtipos de la familia IIa, con claro predominio de un subtipo exclusivo, no descrito previamente en la bibliografía científica. La comparación con datos de otros países sugiere el aislamiento geográfico de los aislados de *C. parvum* circulantes en las explotaciones de ganado vacuno en algunos países de Sudamérica.

**Tercera.** El estudio multilocus revela que los aislados de *C. parvum* de terneros tienen una complejidad genética moderada y mantienen una estructura de poblaciones predominantemente panmíctica. La mayoría de subtipos multilocus fueron únicos y distintivos de determinadas explotaciones, lo que evidencia que la criptosporidiosis se mantiene y transmite fundamentalmente dentro de las granjas.

**Cuarta.** Se describe por primera vez la infección por *C. parvum* en ganado porcino en Colombia, siendo el segundo parásito más prevalente después de *Balantidium coli* en las granjas del Departamento de Cundinamarca. La parasitación por *Cryptosporidium* afecta preferentemente a cerdos en fase de precebo (21-63 días) y cursa habitualmente de forma subclínica.

**Quinta.** *Cryptosporidium* y *Giardia duodenalis* han sido los parásitos intestinales más prevalentes en población humana en la capital de Colombia y en dos Departamentos del suroccidente del país. La infección es más frecuente en niños procedentes de colegios que en muestras de origen hospitalario, así como en individuos de procedencia rural en comparación con los de origen urbano.

**Sexta.** *Cryptosporidium parvum* es la especie responsable de la mayoría de casos de criptosporidiosis humana, siendo *C. hominis* muy poco prevalente. Cabe destacar el

alto porcentaje de portadores asintomáticos y la escasa diversidad genética de ambas especies en el locus GP60, ya que todos los aislados de *C. parvum* y *C. hominis* fueron monomórficos. El estudio molecular de los aislados de *G. duodenalis* revela un patrón de transmisión preferentemente antroponótico, con presencia de los ensamblajes B y All.

**Séptima.** Las experiencias en un modelo murino con diversos péptidos sintéticos diseñados *in silico* revelan que algunas secuencias de la proteína CP15 de *C. parvum* tienen la capacidad de estimular anticuerpos que neutralizan el ingreso del parásito en las células de un cultivo *in vitro*, por lo que podrían ser candidatos para una vacuna frente a la criptosporidiosis. Las lesiones tisulares observadas en los ratones inoculados son consecuencia de la formulación utilizada y no del péptido, lo que aconseja utilizar adyuvantes menos nocivos en futuras investigaciones.



**ANEXOS**

---



## Anexo 1 Aval del comité de ética en investigaciones U.D.C.A



**U.D.C.A**  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS  
APLICADAS Y AMBIENTALES

### UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A VICERRECTORIA DE INVESTIGACIONES

#### COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES

##### ACTA No. 17

**Fecha:** Martes 09 de abril de 2013  
**Hora:** 1:30 p.m.  
**Lugar:** Vicerrectoría de Investigaciones

##### Asistentes:

Dr. William Onatra – Representante Área de Ciencias de la Salud  
Dr. Fernando Gallego – Representante Área de Ciencias Agropecuarias  
Dra. Sandra Parga – Secretaría Técnica Comité de Ética en Investigación

##### No Asistentes:

Dra. Gisela Daza Navarrete – Vicerrectora de Investigaciones  
Dra. Ligia Marlen Forero – Representante Área de Ciencias y Tecnologías  
Dr. William Duarte – Representante Área de Ciencias Agropecuarias  
Dr. Ricardo Luque – Facultad de Medicina

##### Orden del Día

1. Verificación de Quórum
2. Lectura y aprobación del orden del día
3. Lectura, aprobación y seguimiento del Acta No. 16 del 13 de agosto de 2012.
4. Revisión de concepto proyecto titulado "Evaluación de la capacidad de neutralización in vitro de los anticuerpos producidos en ratones albinos suizos frente a las proteínas CP15 y CSL de *Cryptosporidium spp*". Investigador Principal: Catalina Avendaño. Facultad de Ciencias Pecuarias.
5. Revisión concepto del artículo "Variación anatómica: Vena femoral bitroncular con tronco axiofemoral originado de la vena safena externa", de los profesores: Ricardo Miguel Luque Bernal, Yobany Quijano Blanco. Facultad de Enfermería.
6. Guías operativas del comité de ética de Investigación de la U.D.C.A.
7. Propositiones y varios



**U.D.C.A**  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS  
APLICADAS Y AMBIENTALES

### 1. Verificación de Quórum

Siendo las 1:35 p.m. La Dra. Gisela Daza Informa que debido a la realización del taller de acreditación, citado por el Sr Rector, y al cual debe asistir en este momento, no le es posible estar en este Comité, pero requiere que se dé trámite a las solicitudes pendientes para evitar demoras innecesarias.

También se informa que el Doctor William Duarte, la Dra. Ligia Marlen y el Doctor Ricardo Luque no pueden asistir debido a compromisos a los cuales les fue imposible faltar.

Se indica que debido a la existencia de la vacante en el comité, del representante del Área de Ciencias Ambientales, se envió a la Facultad una comunicación donde se solicitaba delegaran a la persona como miembro de esta instancia, y se sugería fuera la Dra. Loreta Rosselli, al momento no se ha recibido respuesta a esta comunicación.

### 2. Lectura y aprobación del orden del día

Se presenta a los asistentes el orden del día propuesto, y se acuerda que el punto N. 6 Guías operativas del comité de ética de Investigación de la U.D.C.A, será tratado en una próxima reunión a realizarse el 23 de abril de 2013 a las 2:00 p.m. y se procede a continuar la reunión.

### 3. Lectura, aprobación y seguimiento del Acta No. 16 del 13 de agosto de 2012

El acta es aprobada sin observaciones

En el seguimiento del acta se comenta:

1. El proyecto "Las condiciones de vida y su producción histórica en el espacio urbano, como determinantes del consumo de drogas en adolescentes de 10 a 18 años de la localidad de Suba, en la ciudad de Bogotá", de la profesora Nelly Caliz, de la Facultad de Enfermería, remitió las aclaraciones solicitadas, por lo cual se emitió la carta de aval el 12 de septiembre de 2012.
2. Revisión concepto proyecto titulado "Estudio filogenético del Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en Colombia. primera fase: evaluación de técnicas moleculares y de proteómica para el estudio de los genes env y gag del Virus de la Leucosis Bovina (VLB).", de la profesora Giovanna Meza Barreto, de la Facultad Ciencia y Tecnología, remitió las aclaraciones solicitadas, por lo cual se emitió la carta de aval el 12 de septiembre de 2012.
3. Revisión concepto proyecto titulado "Reconstrucción de un modelo metabólico computacional a partir del genoma de cepas nativas bogotanas de Helicobacter pylori: identificación de genes esenciales.", del profesor Andrés Julián Gutiérrez Escobar de la Facultad de Medicina, remitió las aclaraciones solicitadas, por lo cual se emitió la carta de aval el 12 de septiembre de 2012.
4. Revisión concepto propuesta Joven Investigador U.D.C.A seleccionado año 2011 titulada "Comparación de los perfiles dermatoglíficos en taekwondistas de Pelotas



**U.D.C.A**  
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS  
APLICADAS Y AMBIENTALES

Brasil y Bogotá Colombia", de Andrés Felipe Bohórquez Aldana de la Facultad de ciencias del Deporte, remitió aclaraciones solicitadas, por lo cual se emitió la carta de aval el 12 de septiembre de 2012.

5. Está pendiente de revisión, por parte del Comité, el formato de plantas el cual está siendo actualizado por el Doctor William Duarte.

Se hace énfasis en que este Comité debe revisar los proyectos desde el punto de vista de la ética,

4. Revisión de concepto proyecto titulado "Evaluación de la capacidad de neutralización in vitro de los anticuerpos producidos en ratones albinos suizos frente a las proteínas CP15 y CSL de *Cryptosporidium spp*". Investigador Principal: Catalina Avendaño. Facultad de Ciencias Pecuarias.

Los miembros del analizaron la propuesta, el Dr. Gallego, la Dra. Ligia, y el Dr. Onatra emitieron su concepto positivo al respecto (conceptos adjuntos), además el Dr. Gallego hizo llegar el formato de compromiso de buen manejo de los animales de experimentación diligenciado por la profesora Catalina.

El Comité de Ética en Investigación da el aval al investigador, para hacer el desarrollo del proyecto ya que cumple los parámetros establecidos por este Comité.

5. Revisión concepto del artículo "Variación anatómica: Vena femoral bitroncular con tronco axiofemoral originado de la vena safena externa", de los profesores: Ricardo Miguel Luque Bernal, Yobany Quijano Blanco. Facultad de Medicina.

El Dr. Onatra aclara que es un caso clínico, donde se realizó una disección a un cadáver del anfiteatro en la U.D.C.A y se halló una vena adicional, y los autores requieren de aval del Comité de Ética para poder hacer la publicación.

El Comité de Ética en Investigación da el aval a los autores para la realización de la publicación.

#### 7. Propositiones y varios

- ✓ Se solicita hacer reuniones de Comité mas seguidas, pues de lo contrario se crea desánimo en los miembros.

Siendo las 2:00 p.m. se da por terminada la reunión.

**GISELA DAZA NAVARRETE**  
Vicerrector de Investigaciones  
Presidente del Comité

**SANDRA PARGA BOHORQUEZ**  
Asistente Profesional  
Vicerrectoría de Investigaciones  
Secretaría Técnica del Comité



## REFERENCIAS

---





- Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A. (2004). Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5669), 441–445.
- Adamu, H., Petros, B., Hailu, A., Petry, F. (2010). Acta Tropica Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ethiopia. *Acta Tropica*, 115(1–2), 77–83.
- Adamu, H., Petros, B., Zhang, G., Kassa, H., Amer, S., Ye, J., Feng, Y., Xiao, L. (2014). Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4), e2831.
- Adesiyun, A. A., Kaminjolo, J. S. (1994). Prevalence and epidemiology of selected enteric infections of livestock in Trinidad. *Preventive Veterinary Medicine*, 19(3–4), 151–165.
- Akinbo, F. O., Okaka, C. E., Omoregie, R., Dearen, T., Leon, E. T., Xiao, L. (2010). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp . in HIV-infected Persons in Benin City , Edo State , Nigeria. *Fooyin J Health Sci*, 2(3–4), 85–89.
- Alarcón, M. A., Beltrán, M., Cárdenas, M. L., & Campos, M. C. (2005). Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 25(3), 353–365.
- Alcadía de Santiago de Cali. (2004). Datos de Cali y el Valle del Cauca. Retrieved August 30, 2015, from [http://www.cali.gov.co/publicaciones/datos\\_de\\_cali\\_y\\_el\\_valle\\_del\\_cauca\\_pub](http://www.cali.gov.co/publicaciones/datos_de_cali_y_el_valle_del_cauca_pub)
- Alexander, J., Brewer, J. M. (1995). Adjuvants and their modes of action. *Research in Immunology*, 42, 153–162.
- Allison, G. M., Rogers, K. A., Borad, A., Ahmed, S., Karim, M. M., Kane, A. V. (2011). Antibody responses to the immunodominant *Cryptosporidium* gp15 antigen and gp15 polymorphisms in a case-control study of cryptosporidiosis in children in Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 97–104.
- Alvarado, B. E., Vásquez, L. R. (2006). Determinantes sociales, prácticas de alimentación y consecuencias nutricionales del parasitismo intestinal en niños de 7 a 18 meses de edad en Guapi, Cauca. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 26(1), 82–94.
- Alves, M., Matos, O., Antunes, F. (2001). Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates drom HIV-infected patients from Portugal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95(6), 627–632.
- Alves, M., Matos, O., Pereira, D. F. I., Delgado, E., Lourenco, A. M., Antunes, F. (2001). Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human HIV-infected and animal hosts. *Journal of Eukaryotic Microbiology, Suppl*, 17S–18S.
- Alves, M., Xiao, L., Antunes, F. (2006). Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, 99(3), 287–92.

- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A. A., Matos, O., Antunes, F. (2003). Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans , Cattle , and Zoo Ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2744–2747.
- Amer, S., Honma, H., Ikarashi, M., Tada, C., Fukuda, Y., Suyama, Y., Nakai, Y. (2010). *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 382–6.
- Amer, S., Zidan, S., Adamu, H., Ye, J., Roellig, D., Xiao, L., Feng, Y. (2013). Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Experimental Parasitology*, 135(3), 518–23.
- Appelbee, A. J., Frederick, L. M., Heitman, T. L., Olson, M. E. (2003). Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology*, 112(4), 289–294.
- Arnon, R., Ben-Yedidia, T. (2003). Old and new vaccine approaches. *International Immunopharmacology*, 3(8), 1195–204.
- Arrowood, M. J., Mead, J. R., Mahrt, J. L., Sterling, C. R. (1989). Effects of immune colostrum and orally administered antisporezoite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. *Infection and Immunity*, 57(8), 2283–2288.
- Arroyo-Salgado, B., Buelvas-Montes, Y., Villalba-Vizcaíno, V., Salomón-Arzuza, O. (2014). Caracterización genética por reacción en cadena de la polimerasa de *Giardia intestinalis* en muestras de humanos y perros del Caribe colombiano. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 32(7), 424–427.
- Atwill, E. R., Sweitzer, R. a., Pereira, M. D. G. C., Gardner, I. a., Van Vuren, D., Boyce, W. M. (1997). Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3946–3949.
- Austin, Z., Alcock, R. E., Christley, R. M., Haygarth, P. M., Heathwaite, a. L., Latham, S. M. (2012). Policy, practice and decision making for zoonotic disease management: Water and *Cryptosporidium*. *Environment International*, 40(1), 70–78.
- Avendaño, C., Amaya, Á., Bayona, M. (2010). Criptosporidiosis En Bovinos En La Región Sabana Centro (Cundinamarca ). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 13(2), 109–116.
- Avendaño, C., Quílez, J., Sánchez-Acedo, C. (2010). *Cryptosporidium* en terneros en el Valle de Ubaté – Chiquinquirá (Colombia). *Revista U.D.C.A Actualización & Divulgación Científica*, 13(1), 41–47.
- Banda, Z., Grimason, A., Nichols, R., Smith, H. V. (2003). Prevalence of *Cryptosporidium* infection in animals in Chikwawa District of Malawi. In *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene in Scotland Meeting at the Colville Building , University of Strathclyde , Glasgow , 21 May 2003 Poster presentations* (pp. 622–624).
- Barnes, D., Bonnin, A., Huang, J. X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J. (1998). A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion.

- Molecular and Biochemical Parasitology*, 96(1–2), 93–110.  
[http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00119-4](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00119-4)
- Barta, J. R., Thompson, R. C. A. (2006). What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, 22(10), 463–468.
- Baruch, A., Isaac-Renton, J., Adam, R. (1996). The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J Infect Dis*, 174(1), 233–236.
- Baskin, G. B. (1996). Cryptosporidiosis of the conjunctiva in SIV-infected rhesus monkeys. *The Journal of Parasitology*, 82(4), 630–2.
- Batista-Duharte, A., Lindblad, E. B., Oviedo-Orta, E. (2011). Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicology Letters*, 203(2), 97–105.
- Bayona, M., Avendaño, C., Amaya, Á. (2011). Criptosporidiosis en población infantil de la región Sabana Centro (Cundinamarca). *Revista U.D.C.A Actualización & Divulgación Científica*, 14(1), 7–13.
- Bedi, B., McNair, N. N., Mead, J. R. (2014). Dendritic cells play a role in host susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunology Letters*, 158(1–2), 42–51. h
- Ben-Yedidia, T., Arnon, R. (1997). Design of peptide and polypeptide vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(4), 442–8.
- Benitez, A. J., McNair, N., Mead, J. R. (2009). Oral immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* encoding *Cryptosporidium parvum* Cp23 and Cp40 antigens induces a specific immune response in mice. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 16(9), 1272–8.
- Benitez, A., Priest, J. W., Ehigiator, H. N., McNair, N., Mead, J. R. (2011). Evaluation of DNA encoding acidic ribosomal protein P2 of *Cryptosporidium parvum* as a potential vaccine candidate for cryptosporidiosis. *Vaccine*, 29(49), 9239–45.
- Bernal, E. (2015). Provincias de Boyacá. Retrieved August 30, 2015, from [http://www.boyacacultural.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=130&Itemid=32](http://www.boyacacultural.com/index.php?option=com_content&view=article&id=130&Itemid=32)
- Bethke, J., Rojas, V., Berendsen, J., Cárdenas, C., Guzmán, F., Gallardo, J. A., Mercado, L. (2012). Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 35(5), 379–88.
- Bhat, N., Joe, A., PereiraRerrin, M., Ward, H. D. (2007). *Cryptosporidium* p30, a galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin, mediates infection in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 34877–34887.
- Bjorneby, J. M., Riggs, M. W., Perryman, L. E. (1990). *Cryptosporidium parvum* merozoites share neutralization-sensitive epitopes with sporozoites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(1), 298–304.
- Blanco, M. A., Iborra, A., Vargas, A., Nsie, E., Mbá, L., Fuentes, I. (2009). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Equatorial Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(12), 1282–4.

- Boeke, C. E., Mora-Plazas, M., Forero, Y., Villamor, E. (2010). Intestinal protozoan infections in relation to nutritional status and gastrointestinal morbidity in Colombian school children. *Journal of Tropical Pediatrics*, 56(5), 299–306.
- Bonafonte, M. T., Smith, L. M., Mead, J. R. (2000). A 23-kDa recombinant antigen of *Cryptosporidium parvum* induces a cellular immune response on in vitro stimulated spleen and mesenteric lymph node cells from infected mice. *Experimental Parasitology*, 96(1), 32–41.
- Bonnin, A., Ojcius, D. M., Souque, P., Barnes, D. A., Doyle, P. S., Gut, J. (2001). Characterization of a monoclonal antibody reacting with antigen-4 domain of gp900 in *Cryptosporidium parvum* invasive stages. *Parasitology Research*, 87(8), 589–92.
- Borad, A. J., Allison, G. M., Wang, D., Ahmed, S., Karim, M. M., Kane, A. V. (2012). Systemic antibody responses to the immunodominant p23 antigen and p23 polymorphisms in children with cryptosporidiosis in Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(2), 214–222.
- Botero-Garcés, J. H., García-Montoya, G. M., Grisales-Patiño, D., Aguirre-Acevedo, D. C., Álvarez-Urbe, M. C. (2009). *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia, May to October 2006. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(3), 155–162.
- Boulter-Bitzer, J. I., Lee, H., Trevors, J. T. (2007). Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. *Biotechnology Advances*, 25(1), 13–44.
- Bouzig, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M., Tyler, K. M. (2013). *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 115–134.
- Brogia, A., Reckinger, S., Cacció, S. M., Nöckler, K. (2008). Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology*, 154(1–2), 8–13.
- Brook, E., Hart, C. A., French, N., Christley, R. (2008). Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, 152(1–2), 46–52.
- Brook, E., Anthony Hart, C., French, N. P., Christley, R. M. (2009). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Veterinary Journal*, 179(3), 378–82.
- Budu-Amoako, E., Greenwood, S. J., Dixon, B. R., Barkema, H. W., Hurnik, D., Estey, C., McClure, J. T. (2012). Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, 184(1), 18–24.
- Bushen, O. Y., Lima, A. A. M., Guerrant, R. L. (2006). Cryptosporidiosis. In R. L. Guerrant, D. H. Walker, Weller, P. F. (Eds.), *Tropical Infectious Diseases* (Second edi, pp. 1003–1014). Elsevier.
- Bushen, O. Y., Kohli, A., Pinkerton, R. C., Dupnik, K., Newman, R. D., Sears, C. L. (2007). Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*.

- Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 378–384.
- Cacciò, S., Homan, W., Camilli, R., Traldi, G., Kortbeek, T., Pozio, E. (2000). A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 120(3), 237–244.
- Cacciò, S., Spano, F., Pozio, E. (2001). Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*, 31(10), 1082–6.
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023–1030.
- Caccio, S. M., Thompson, R. A., McLauchlin, J., Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21(9), 430–437.
- Cacciò, S. M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., Pozio, E. (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*, 38(13), 1523–1531.
- Cacciò, S. (2012). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In D. Warrell, T., Cox, J. Firth, & E. Török (Eds.), *Textbook of Medicine: Infection* (Fifth edit, pp. 721–728). Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.
- Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Mariano, V., Valentini, S., Berti, F., Tosini, F., Pozio, E. (2013). A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. *Veterinary Parasitology*, 191(1–2), 128–131.
- Cacciò, S. M., Widmer, G. (2014). *Cryptosporidium: parasite and disease*. (Cacciò, S. M., Windmer, G. Eds.) *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer-Verlag Wien.
- Cacciò, S. M., de Waele, V., Widmer, G. (2015). Geographical segregation of *Cryptosporidium parvum* multilocus genotypes in Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 31(April), 245–249.
- Cadavid-Betancur, D. A., Giraldo-Echeverri, C., Sierra-Bedoya, S., Montoya-Pino, M., Chaparro-Gutiérrez, J., Restrepo-Botero, J. E., Olivera-Ángel, M. (2014). Diarrea neonatal bovina en un hato del altiplano norte de Antioquia. *Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 120–129.
- Cama, V. A., Bern, C., Sulaiman, I. M., Gilman, R. H., Ticona, E., Vivar, A. (2003). *Cryptosporidium* Species and Genotypes in HIV-Positive Patients in Lima, Peru. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(SUPPL.), 531–533.
- Cama, V. A., Ross, J. M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D. (2007). Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(5), 684–91.
- Cama, V. A., Bern, C., Roberts, J., Cabrera, L., Sterling, C. R., Ortega, Y. (2008).

- Cryptosporidium* Species and Subtypes and Clinical. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1567–1574.
- Camero, L., Shulaw, W. P., Xiao, L. (2003). Characterization of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a protein with homology to long chain fatty acid synthetase. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 Suppl, 534–538.
- Cardona, G. A., Carabin, H., Goñi, P., Arriola, L., Robinson, G., Fernández-crespo, J. C. (2013). Science of the Total Environment Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *The Science of the Total Environment*, 412–413(2011), 101–108.
- Carmena, D. (2010). Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. In Méndez-Vilas (Ed.), *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* (pp. 3–14).
- Carreño, M., Velasco, C., Rueda, E. (2005). Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en niños menores de 13 años con afecciones oncológicas. *Colombia Médica*, 36(2), 6–9.
- Casemore, D. P. (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 44(6), 445–451.
- Castro-Hermida, J. A., Almeida, A., González-Warleta, M., Da Costa, J. M. C., Mezo, M. (2006). Prevalence and preliminary genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from asymptomatic heifers in Galicia (NW, Spain). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 Suppl 1, S22-3.
- Causape, A., Sanchez-Acedo, C., Quilez, J., del Cacho, E., Viu, M. (1999). Efficacy of halofuginone lactate against natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Res. Rev. Parasitol.*, 59, 59, 41–46.
- Cavalier-Smith, T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, 50(5), 472–495.
- Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., Cacciò, S. M. (2017). Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, 33(7), 561–576.
- Cevallos, A. M., Zhang, X., Waldor, M. K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S. (2000). Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infection and Immunity*, 68(7), 4108–4116.
- Chalmers, R. M., Ferguson, C., Cacciò, S., Gasser, R. B., Abs EL-Osta, Y. G., Heijnen, L. (2005). Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal for Parasitology*, 35(4), 397–410.
- Chalmers, R. M., Davies, A. P. (2010). Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124(1), 138–46.
- Chalmers, R. M., Campbell, B. M., Crouch, N., Charlett, A., Davies, A. P. (2011). Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *Journal of Medical Microbiology*, 60(11), 1598–1604.

- Chalmers, R. M., Giles, M. (2010). Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1487–1497.
- Chalmers, R. M., Elwin, K., Hadfield, S. J., Robinson, G. (2011). Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 536–538.
- Chalmers, R. M., Smith, R. P., Hadfield, S. J., Elwin, K., Giles, M. (2011). Zoonotic linkage and variation in *Cryptosporidium parvum* from patients in the United Kingdom. *Parasitology Research*, 108(5), 1321–1325.
- Chalmers, R., Smith, R., Elwin, K., Clifton-Hadley, F., Giles, M. (2011). Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004–2006. *Epidemiology and Infection*, 139(5), 700–712.
- Chalmers, R. M. (2012). Cryptosporidiosis. In OIE (Ed.), *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (7th editio, pp. 1192–1215). OIE. Retrieved from [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.09.04\\_CRYPTO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.04_CRYPTO.pdf)
- Chalmers, R. M. (2014). *Cryptosporidium*. In S. Percival, M. Yates, D. Williams, R. Chalmers, N. Gray (Eds.), *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks* (Second Edi, pp. 287–326). Elsevier.
- Chalmers, R. M., Katzer, F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, 29(5), 237–51.
- Chalmers, R. M., Atchison, C., Barlow, K., Young, Y., Roche, A., Manuel, R. (2015). An audit of the laboratory diagnosis of cryptosporidiosis in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology*, 64(7), 688–93.
- Chang, J. C. C., Diveley, J. P., Savary, J. R., Jensen, F. C. (1998). Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, 173–186.
- Chappell, C., Okhuysen, P., White, A. C. (2003). Immunity to *Cryptosporidium*. In R. . Thompson, A. Armson, U. M. Ryan (Eds.), *Cryptosporidium from molecules to disease* (First edit, pp. 28–50). Amsterdam: Elsevier B.V.
- Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D. E., Tanriverdi, S., Tzipori, S. (2006). *Cryptosporidium hominis*: Experimental challenge of healthy adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), 851–857.
- Chartier, C., Rieux, A., Delafosse, A., Lehebel, A., Paraud, C. (2013). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh calf faeces: Characteristics of two simple tests and evaluation of a semi-quantitative approach. *Veterinary Journal*, 198(1), 148–152.
- Chaves, P., Fernández, J. A., Ospina, I., López, M. C., Moncada, L., Reyes, P. (2007). Tendencia de la prevalencia y factores asociados a la infección por *Giardia duodenalis* en escolares y preescolares de una zona rural de Cundinamarca. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 27, 345–351.
- Checkley, W., White, A. C., Jaganath, D., Arrowood, M. J., Chalmers, R. M., Chen, X. M. (2015). A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(1), 85–

- 94.
- Chen, F., Huang, K. (2007). Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. *Zoonoses and Public Health*, 54(9–10), 393–400.
- Chen, Z., Mi, R., Yu, H., Shi, Y., Huang, Y., Chen, Y. (2011). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Shanghai, China. *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 113–119.
- Cheng, X., Keithly, J. S., Paya, C., LaRusso, N. (2002). Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*, 346(22), 1723–1731.
- Cimon, K. Y., Oberst, R. D., Upton, S. J., Mosier, D. A. (1996). Biliary cryptosporidiosis in two corn snakes (*Elaphe guttata*). *J Vet Diagn Invest* 8:398–399, 8(3), 398–399.
- Clark, D. P., Sears, C. L. (1996). The pathogenesis of Cryptosporidiosis. *Parasitology Today*, 12(6), 221–225.
- Clode, P. L., Koh, W. H., Thompson, R. C. A. (2015). Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*, 31(12), 614–624.
- Codices, V., Martins, C., Novo, C., Sousa, B. De, Lopes, Â., Borrego, M., Matos, O. (2013). Experimental Parasitology Dynamics of cytokines and immunoglobulins serum profiles in primary and secondary *Cryptosporidium parvum* infection: Usefulness of Luminex Ò xMAP technology. *Experimental Parasitology*, 133(1), 106–113.
- Coklin, T., Farber, J., Parrington, L., Dixon, B. (2007). Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, 150(4), 297–305.
- Coklin, T., Uehlinger, F. D., Farber, J. M., Barkema, H. W., O’Handley, R. M., Dixon, B. R. (2009). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, 160(3–4), 323–6.
- Congreso Nacional de Colombia. Ley 84 de 1989 (1989). Colombia: Congreso de Colombia.
- Cook, N., Paton, C. A., Wilkinson, N., Nichols, R. A. B., Barker, K., Smith, H. V. (2006). Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. *International Journal of Food Microbiology*, 109(3), 215–221.
- Corso, P., Kramer, H., Blair, K., Addiss, D., Davis, J., Haddix, A. (2003). Costs of Illness in the 1993 Waterborne *Cryptosporidium* Outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, 9(4), 426–431.
- Cruickshank, R., Ashdown, L., Croese, J. (1988). Human Cryptosporidiosis in North Queensland. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 18(4), 582–586.
- Current, W., Reese, N., Ernst, J., Bailey, W., Heyman, M., Weinstein, W. (1983). Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.*, 308(21), 1252–1257.



- Current, W. L. (1985). Cryptosporidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(12), 1334–8.
- Current, W. L., Reese, N. C. (1986). A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33(1), 98–108.
- Curtidor, H., Patarroyo, M. E., Patarroyo, M. A. (2015). Recent advances in the development of a chemically synthesised anti-malarial vaccine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(11), 1–15.
- Curtidor, H., Reyes, C., Bermúdez, A., Vanegas, M., Varela, Y., Patarroyo, M. (2017). Conserved Binding Regions Provide the Clue for Peptide-Based Vaccine Development: A Chemical Perspective. *Molecules*, 22(12), 2199.
- de Arango, M., Rodríguez, A., Prada, N. (2006). Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en materia fecal de niños entre un mes y trece años en un hospital local colombiano. *Colombia Médica*, 37(2), 121–125.
- de Graaf, D. C., Spano, F., Petry, F., Sagodira, S., Bonnin, A. (1999). Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or fantasy. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1289–306.
- de Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., Peeters, J. E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1269–87.
- de Lucio, A., Merino, F. J., Martínez-Ruiz, R., Bailo, B., Aguilera, M., Fuentes, I., Carmena, D. (2015). Molecular genotyping and sub-genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(12), e0143981.
- de Waele, V., Van den Broeck, F., Huyse, T., McGrath, G., Higgins, I., Speybroeck, N. (2013). Panmictic structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Irish calves: Influence of prevalence and host movement. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2534–2541.
- Del Coco, V. F., Córdoba, M. A., Basualdo, J. A. (2008). *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 158(1–2), 31–5.
- Del Coco, V. F., Córdoba, M. A., Bilbao, G., de Almeida Castro, A. P., Basualdo, J. A., Fayer, R., Santín, M. (2014). *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Research in Veterinary Science*, 96(2), 311–4.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2010). Boletín Censo General 2005. Antioquia. Retrieved from [https://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL\\_PDF\\_CG2005/05000T7T000.PDF](https://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/05000T7T000.PDF)
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2010). Boletín Censo General 2005. Bogotá. Retrieved August 30, 2015, from [http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL\\_PDF\\_CG2005/11000T7T000.PD](http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/11000T7T000.PD)

F

Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2010). Boletín Censo General 2005. Boyacá. Retrieved August 30, 2015, from [http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL\\_PDF\\_CG2005/15000T7T000.PDF](http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/15000T7T000.PDF)

Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2010). Boletín Censo General 2005. Cundinamarca. Retrieved August 30, 2015, from [http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL\\_PDF\\_CG2005/25000T7T000.PDF](http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/25000T7T000.PDF)

Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2010). Boletín Censo General 2005. Nariño. Retrieved August 30, 2015, from [http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL\\_PDF\\_CG2005/52000T7T000.PDF](http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/52000T7T000.PDF)

Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2010). Boletín Censo General 2005. Valle del Cauca. Retrieved August 30, 2015, from [http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL\\_PDF\\_CG2005/76000T7T000.PDF](http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/76000T7T000.PDF)

Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE. (2010). Censo General 2005. Perfil Colombia. Retrieved August 4, 2015, from [https://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL\\_PDF\\_CG2005/00000T7T000.PDF](https://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/00000T7T000.PDF)

Díaz, P., Quílez, J., Chalmers, R. M., Panadero, R., López, C., Sánchez-Acedo, C. (2010). Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*, 137(8), 1187–93.

Díaz, P., Hadfield, S. J., Quílez, J., Soilán, M., López, C., Panadero, R. (2012). Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in north west Spain. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 188–195.

Dixon, B. (2009). The role of livestock in the foodborne transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. to humans. In Ortega-Pierres, G., Cacciò, S., Fayer, R., Mank, T., Smith, H., Thompson, R. (Eds.), *Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease* (pp. 107–122).

do Couto, M. C., Lima, M. de F., do Bomfim, T. C. (2014). New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Tropica*, 130(1–2), 117–122.

Drinkall, E., Wass, M. J., Co, T. J., Flynn, R. J. (2017). A rapid IL-17 response to *Cryptosporidium parvum* in the bovine intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191(June), 1–4.

Drumo, R., Widmer, G., Morrison, L. J., Tait, A., Grelloni, V., D'Avino, N. (2012). Evidence of host-associated populations of *Cryptosporidium parvum* in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3523–3529.

Dubey, J., Speer, C., Fayer, R. (1990). *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press.

- Egyed, Z., Sréter, T., Széll, Z., Varga, I. (2003). Characterization of *Cryptosporidium* spp. recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, 111(2–3), 103–14.
- Ehigiator, H. N., McNair, N., Mead, J. R. (2007). *Cryptosporidium parvum*: the contribution of Th1-inducing pathways to the resolution of infection in mice. *Experimental Parasitology*, 115(2), 107–13.
- Ehigiator, H. N., Romagnoli, P., Priest, J. W., Secor, W. E., Mead, J. R. (2007). Induction of murine immune responses by DNA encoding a 23-kDa antigen of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research*, 101(4), 943–950.
- ElBakri, A., Mogane, L., Ezzedine, S., AbuOdeh, R., Bessong, P., Potgeiter, N., Samie, A. (2014). Real Time PCR detection and prevalence determination of *Cryptosporidium* species in stool specimens from the United Arab Emirates. *International Journal of Infectious Diseases*, 21, 160.
- Elgun, G., Koltas, I. S. (2011). Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitology Research*, 108(2), 395–397.
- Eligio-García, L., Cortes-Campos, A., Cota-Guajardo, S., Gaxiola, S., Jiménez-Cardoso, E. (2008). Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using  $\beta$ -giardin restriction gene. *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 205–209.
- Elsafi, S. H., Al-Sheban, S. S., Al-Jubran, K. M., Abu Hassan, M. M., Al Zahrani, E. M. (2014). Comparison of Kinyoun's acid-fast and immunofluorescent methods detected an unprecedented occurrence of *Cryptosporidium* in the Eastern Region of Saudi Arabia. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 9(4), 263–267.
- Elwin, K., Chalmers, R. M., Roberts, R., Guy, E. C., Casemore, D. P. (2001). Modification of a Rapid Method for the Identification of Gene-Specific Polymorphisms in *Cryptosporidium parvum* and Its Application to Clinical and Epidemiological Investigations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5581–5584.
- Elwin, K., Hadfield, S. J., Robinson, G., Crouch, N. D., Chalmers, R. M. (2012). *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*, 42(7), 675–682.
- Enemark, H. L., Ahrens, P., Juel, C. D., Petersen, E., Petersen, R. F., Andersen, J. S. (2002). Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. *Parasitology*, 125(Pt 4), 331–41.
- Enemark, H. L., Ahrens, P., Lowery, C. J., Thamsborg, S. M., Enemark, J. M. D., Bille-Hansen, V., Lind, P. (2002). *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: Identification and preliminary characterisation. *Veterinary Parasitology*, 107(1–2), 37–49.
- Enemark, H. L., Ahrens, P., Bille-Hansen, V., Heegaard, P. M. H., Vigre, H., Thamsborg, S. M., Lind, P. (2003). *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the porcine genotype. *Parasitology*, 126(5), 407–416.

- Enemark, H. L., Bille-hansen, V., Lind, P., Heegaard, P. M. H., Vigre, H., Ahrens, P., Thamsborg, S. M. (2003). Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* — evaluation of an animal infection model. *Vet Parasitol*, 113, 35–57.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Ezzaty Mirhashemi, M., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F. E., Mulcahy, G., De Waal, T. (2015). Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental Parasitology*, 151–152, 14–20.
- Fall, M., Sarr, M., Signate-Sy, H., Sow, H., Ould Cheikh, A., Ndiaye, A. (1989). Epidemiological study of diarrhea in children 0-5 yr of age. *Dakar Med.*, 34(1–4), 166–71.
- Faria, C. P., Zanini, G. M., Dias, G. S., da Silva, S., Sousa, M. do C. (2017). New multilocus genotypes of *Giardia lamblia* human isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 128–137.
- Farkas, K., Plutzer, J., Moltchanova, E., Török, A., Varró, M. J., Domokos, K. (2015). Serological responses to *Cryptosporidium* antigens in inhabitants of Hungary using conventionally filtered surface water and riverbank filtered drinking water. *Epidemiology and Infection*, 143(13), 2743–2747.
- Fayer, R., Guidry, A., Blagburn, B. L. (1990). Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infection and Immunity*, 58(9), 2962–2965.
- Fayer, R., Speer, C., Dubey, J. (1997). The general biology of *Cryptosporidium*. In Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (pp. 1–42). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: Dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 49–56.
- Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M., Graczyk, T. K., Jenkins, M. C., Higgins, J., ... Lal, A. A. (1999). *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 706–710.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1305–1322.
- Fayer, R., Trout, J. M., Xiao, L., Morgan, U. M., Lai, A. A., Dubey, J. P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *The Journal of Parasitology*, 87(6), 1415–1422.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126(1–2), 37–56.
- Fayer, R., Santín, M., Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*, 91(3), 624–629.

- Fayer, R., Santín, M., Trout, J. M., Greiner, E. (2006). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 105–12. Fayer, R. (2008). General biology. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (Second Edi, pp. 1–42). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Fayer, R., Santín, M., Trout, J. M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 191–8.
- Fayer, R., Santín, M. (2009). *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), 192–200.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124(1), 90–7.
- Fayer, R., Santín, M., Dargatz, D. (2010). Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow – calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, 170(3–4), 187–192.
- Fayer, R., Santín, M., Macarisin, D. (2010). *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 172(1–2), 23–32.
- FEDEGAN. (2011). *Situación en Colombia de enfermedades bovinas no sujetas al control oficial*. (FEDEGAN, Ed.) (Primera ed). Bogotá D.C: FEDEGAN.
- FEDEGAN. (2012). Inventario Bovino Nacional. Retrieved July 17, 2015, from <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/inventario-bovino-nacional>
- FEDEGAN. (2014). *Plan de desarrollo ganadero 2014-2019*. (FEDEGAN, Ed.) (Primera ed). Bogotá D.C., Colombia: Fondo Nacional del Ganado.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., Spratt, B. G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1518–1530.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(783–791).
- Feltus, D. C., Giddings, C. W., Schneck, B. L., Monson, T., Warshauer, D., McEvoy, J. M. (2006). Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4303–4308.
- Feltus, D. C., Giddings, C. W., Khaitisa, M. L., McEvoy, J. M. (2008). High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Veterinary Parasitology*, 151(2–4), 191–5.
- Feng, X., Rich, S. M., Akiyoshi, D., Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N. (2000). Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3344–3349.
- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X. (2007). Wide geographic

- distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, 144(1–2), 1–9.
- Feng, Y., Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–140.
- Feng, Y., Torres, E., Li, N., Wang, L., Bowman, D., Xiao, L. (2013). Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. *International Journal for Parasitology*, 43(14), 1141–7.
- Fink, M. Y., Singer, S. M. (2017). The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends in Parasitology*, S1471-4922(17), 30189–30197.
- Fleta, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., Quílez, J. (1995). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology*, 59(3–4), 201–205.
- Fletcher, R., Fletcher, S., Wagner, E. (1996). *Clinical epidemiology*. (T. Satterfield, Ed.) (3rd ed.). Baltimor, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Flórez, A. C., García, D. A., Moncada, L., Beltrán, M. (2003). Prevalencia de microsporidios y otros parásitos intestinales en pacientes con infección por VIH, Bogotá, 2001. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 23(3), 274–282.
- Forney, J. R., Yang, S., Du, C., Healey, M. C. (1996). Efficacy of serine protease inhibitors against *Cryptosporidium parvum* infection in a bovine fallopian tube epithelial cell culture system. *The Journal of Parasitology*, 82(4), 638–40.
- Foster, D. M., Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25(1), 13–36.
- Fournet, N., Deege, M. P., Urbanus, A. T., Nichols, G., Rosner, B. M., Chalmers, R. M. (2012). Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Eurosurveillance*, 18(2), 3–7.
- Fritzler, J. M., Zhu, G. (2007). Functional characterization of the acyl-[acyl carrier protein] ligase in the *Cryptosporidium parvum* giant polyketide synthase. *International Journal for Parasitology*, 37(3–4), 307–316.
- Gabr, N. S., Abdellatif, M. Z. M., Abd El-Hafeez, E., Abd Rabou, R. A. M. (2014). Comparison between ELISA and various stains techniques in laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 44(2), 509–16.
- Gatei, W., Suputtamongkol, Y., Waywa, D., Ashford, R., Bailey, J., Greensill, J. (2002). Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol*, 96(8), 797–802.
- Gatei, W., Greensill, J., Ashford, R. W., Luis, E., Parry, C. M., Cunliffe, N. A. (2003). Molecular Analysis of the 18S rRNA Gene of *Cryptosporidium* Parasites from Patients with or without Human Immunodeficiency Virus Infections Living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam Molecular Analysis of the 18S rRNA Gene of Cryp. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1458–1462.

- Gatei, W., Das, P., Dutta, P., Sen, A., Cama, V., Lal, A. A., Xiao, L. (2007). Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 7(2), 197–205.
- Gatei, W., Barrett, D., Lindo, J. F., Eldemire-shearer, D. (2008). Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 841–843.
- Geurden, T., Berkvens, D., Martens, C., Casaert, S., Vercruysse, J., & Claerebout, E. (2007). Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*, 134(Pt.14), 1981–1987.
- Gatei, W., Wamae, C. N., Mbae, C., Waruru, A., Mulinge, E., Waithera, T. (2006). Cryptosporidiosis: Prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(1), 78–82.
- Geurden, T., Goma, F. Y., Siwila, J., Phiri, I. G. K., Mwanza, A. M., Gabriel, S. (2006). Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Veterinary Parasitology*, 138(3–4), 217–22.
- Giadinis, N. D., Papadopoulos, E., Panousis, N., Papazahariadou, M., Lafi, S. Q., Karatzias, H. (2007). Effect of halofuginone lactate on treatment and prevention of lamb cryptosporidiosis: an extensive field trial. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(6), 578–82.
- Giraldo-Gómez, J. M., Lora, F., Henao, L. H., Mejía, S., Gómez-Marín, J. E. (2005). Prevalencia de Giardiasis y parásitos intestinales en preescolares de hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 7(3), 327–338.
- Gobernación de Antioquia. (2016). Datos de Antioquia. Retrieved November 1, 2017, from <http://antioquia.gov.co/index.php/antioquia/datos-de-antioquia>
- Gobernación de Boyacá. (2015). Mi Boyacá - Localización. Retrieved August 30, 2015, from <http://www.boyaca.gov.co/mi-boyacá/localizacion>
- Gobernación de Cundinamarca. (2015). Gobernación de Cundinamarca. Retrieved August 30, 2015, from <http://www.cundinamarca.gov.co/wps/portal/Home/Cundinamarca.gc>
- Gobernación de Cundinamarca. Secretaria de salud. (2013). *Análisis de la situación en salud con el modelo de los determinantes sociales de salud*. Cundinamarca. Retrieved from [http://www.cundinamarca.gov.co/wps/wcm/connect/b295dc6d-9567-4706-b8cf-e88ef114627d/ASIS+Cundinamarca+2013++V3-06072014.pdf?MOD=AJPERES&ASIS\\_DEPARTAMENTAL](http://www.cundinamarca.gov.co/wps/wcm/connect/b295dc6d-9567-4706-b8cf-e88ef114627d/ASIS+Cundinamarca+2013++V3-06072014.pdf?MOD=AJPERES&ASIS_DEPARTAMENTAL)
- Gobernación de Nariño. (2012). Historia de nuestro departamenteo - Departamenteo de Nariño. Retrieved August 30, 2015, from <http://www.narino.gov.co/index.php/nuestro-departamento/historia>
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Hernández-Córdova, G. A., Ares-Mazás, M. E. (2005). A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *International Journal of Food Microbiology*,

- 102(1), 57–62.
- Goodgame, R. W., Genta, R. M., White, A. C., Chappell, C. L. (1993). Intensity of infection in AIDS-associated cryptosporidiosis. *Journal of Infectious Diseases*, 167(3), 704–709.
- Gormley, F., Little, C., Chalmers, R., Rawal, N., Adak, G. (2011). Zoonotic Cryptosporidiosis from Petting Farms, England and Wales, 1992–2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 151–152.
- Graczyk, T., Fayer, R., Lewis, E., Farley, C., Trout, J. (1997). In vitro interactions between hemocytes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol*, 83(5), 949–952.
- Greaves, P. (2000). IX . Urinary Tract. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Second Edi, pp. 545–626). Leicester, UK.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890.
- Guerrant, D. I., Moore, S. R., Lima, a a, Patrick, P. D., Schorling, J. B., Guerrant, R. L. (1999). Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(5), 707–713.
- Guselle, N. J., Appelbee, A. J., & Olson, M. E. (2003). Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Veterinary Parasitology*, 113(1), 7–18.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelièvre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G. (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates obtained from humans. *J Clin Microbiol*, 39(10), 3472–3480.
- Guzmán, F., Barberis, S., Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 279–314.
- Hadfield, S. J., Robinson, G., Elwin, K., Chalmers, R. M. (2011). Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 918–924.
- Hadfield, S. J., Pachebat, J. A., Swain, M. T., Robinson, G., Cameron, S. J. S., Alexander, J. (2015). Generation of whole genome sequences of new *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates directly from stool samples. *BMC Genomics*, 16(1), 650.
- Hajdusek, O., Ditrich, O., Slapeta, J. (2004). Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122(3), 183–92.
- Hamnes, I. S., Gjerde, B., Robertson, L. (2006). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Veterinary Parasitology*, 140(3–4), 204–16.
- Hamnes, I. S., Gjerde, B. K., Forberg, T., Robertson, L. J. (2007). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Veterinary Parasitology*, 144(3–4), 222–33.



- Hannah, J., Riordan, T. (1988). Case to case spread of cryptosporidiosis; Evidence from a day nursery outbreak. *Public Health*, 102(6), 539–544.
- Haubold, B., Hudson, R. R. (2000). LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. Linkage Analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16(9), 847–848.
- He, H., Zhao, B., Liu, L., Zhou, K., Qin, X., Zhang, Q. (2004). The humoral and cellular immune responses in mice induced by DNA vaccine expressing the sporozoite surface protein of *Cryptosporidium parvum*. *DNA and Cell Biology*, 23(5), 335–9.
- Heine, J. (1982). Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B*, 29(4), 324–327.
- Heine, J., Pohlenz, J., Moon, H., Woode, G. (1984). Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *J Infect Dis*, 150(5), 768–775.
- Helmy, Y. A., Krücken, J., Nöckler, K., Samson-himmelstjerna, G. Von, Zessin, K. (2013). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Veterinary Parasitology*, 193(1–3), 15–24.
- Henriksen, S., Pohlenz, J. (1981). Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Act Vet Scand*, 22(3–4), 594–596.
- Herges, G. R., Widmer, G., Clark, M. E., Khan, E., Giddings, C. W., Brewer, M., Mcevoy, J. M. (2012). Evidence that *Cryptosporidium parvum* Populations Are Panmictic and Unstructured in the Upper Midwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 8096–8101.
- Hernández-Gallo, N., Cortés-Vecino, J. (2012). Prevalencia y factores de riesgo de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en terneros de ganado lechero de la zona noroccidental de la Sabana de Bogotá *Cryptosporidium*. *Revista de Salud Pública*, 14(1), 169–181.
- Hijawi, N., Ng, J., Yang, R., Atoum, M. F. M., Ryan, U. (2010). Experimental Parasitology Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Experimental Parasitology*, 125(2), 161–164.
- Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A., Thompson, R. C. (1997). Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *The Journal of Parasitology*, 83(1), 44–51.
- Hotchkiss, E. J., Gilray, J. A., Brennan, M. L., Christley, R. M., Morrison, L. J., Jonsson, N. N. (2015). Development of a framework for genotyping bovine-derived *Cryptosporidium parvum*, using a multilocus fragment typing tool. *Parasites and Vectors*, 8, 500.
- Houghten, R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(August), 5131–5.
- Hunter, P. R., Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of

- typing systems: an application of Simpson's index of Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2466.
- Hunter, P. R., Chalmers, R. M., Syed, Q., Hughes, L. S., Woodhouse, S., Swift, L. (2003). Foot and mouth disease and cryptosporidiosis: possible interaction between two emerging infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 109–12.
- Hunter, P. R., Hadfield, S. J., Wilkinson, D., Lake, I. R., Harrison, F. C. D., Chalmers, R. M. (2007). Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 82–88.
- IBM Corp. (2012). SPSS Statistics for Macintosh. Armonk, NY: IBM.
- Ichikawa-Seki, M., Aita, J., Masatani, T., Suzuki, M., Nitta, Y., Tamayose, G. (2014). Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two different Japanese prefectures, Okinawa and Hokkaido. *Parasitology International*, 64(2), 161–166.
- Imre, K., Lobo, L. M., Matos, O., Popescu, C., Genchi, C., Dărbăuş, G. (2011). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections? *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 321–4.
- Instituto Colombiano Agropecuario. ICA. (2015). Censo Pecuario Nacional 2015. Retrieved August 30, 2015, from <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2008.aspx>
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (1999). Mapa de la República de Colombia - Mapa oficial político - administrativo. Retrieved August 4, 2015, from [http://geoportal.igac.gov.co/mapas\\_de\\_colombia/IGAC/politicoseg.pdf](http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/IGAC/politicoseg.pdf)
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (2014). Departamento de Antioquia - Mapa oficial político - administrativo. Retrieved from <http://www.igac.gov.co:10040/wps/portal/igac/raiz/iniciohome/MapasdeColombia/Mapas/Departamentales>
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (2014). Departamento de Boyacá - Mapa político - administrativo. Retrieved August 30, 2015, from [http://geoportal.igac.gov.co/mapas\\_de\\_colombia/igac/politicos\\_admin\\_2014/Boyaca.pdf](http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/igac/politicos_admin_2014/Boyaca.pdf)
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (2014). Departamento de Cundinamarca - División político - administrativa. Retrieved August 30, 2015, from [http://geoportal.igac.gov.co/mapas\\_de\\_colombia/igac/politicos\\_admin\\_2014/Cundinamarca.pdf](http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/igac/politicos_admin_2014/Cundinamarca.pdf)
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (2014). Departamento de Nariño - Mapa político - administrativo. Retrieved August 30, 2015, from [http://geoportal.igac.gov.co/mapas\\_de\\_colombia/igac/politicos\\_admin\\_2014/Narino.pdf](http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/igac/politicos_admin_2014/Narino.pdf)
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (2014). Departamento del Valle del Cauca - Mapa político - administrativo. Retrieved August 30, 2015, from

- [http://geoportal.igac.gov.co/mapas\\_de\\_colombia/igac/politicos\\_admin\\_2014/Valle\\_del\\_Cauca.pdf](http://geoportal.igac.gov.co/mapas_de_colombia/igac/politicos_admin_2014/Valle_del_Cauca.pdf)
- Instituto Nacional de Salud - Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública. (2016). *Boletín Epidemiológico Número 52 de 2016 - Colombia. Boletín Epidemiológico Semanal* (Vol. 52). Retrieved from [http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn Epidemiolgico/2016 Boletín epidemiológico semana 52 - .pdf](http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Boletn%20epidemiolgico%20semana%2052-.pdf)
- Iseki, M. (1979). *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jap. J. Parasitol.*, 28, 285–307.
- Jankowska-Mąkosa, A., Knecht, D. (2015). The influence of endoparasites on selected production parameters in pigs in various housing systems. *Research in Veterinary Science*, 100, 153–160.
- Jeníková, M., Němejč, K., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M. (2011). New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Veterinary Parasitology*, 176(2–3), 120–125.
- Jenkins, M. C., Fayer, R. (1995). Cloning and expression of cDNA encoding an antigenic *Cryptosporidium parvum* protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71(1), 149–152.
- Jenkins, M., Trout, J., Fayer, R. (1997). A semi-quantitative method for measuring *Cryptosporidium parvum* infection using polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 28(2), 99–107.
- Jenkins, M. C., O'Brien, C., Trout, J., Guidry, A., Fayer, R. (1998). Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine*, 17(19), 2453–2460.
- Jenkins, M. C., Trout, J., Fayer, R. (1998). Development and application of an improved semiquantitative technique for detecting low-level *Cryptosporidium parvum* infections in mouse tissue using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*, 84(1), 182–186.
- Jenkins, M. C., Trout, J., Abrahamsen, M. S., Lancto, C. A., Higgins, J., Fayer, R. (2000). Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction ( RT-PCR ) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 97–106.
- Jenkins, M. C., Trout, J. M., Higgins, J., Fayer, R., Smith, J., Veal, D., Dorsch, M. (2002). *Advancing Cryptosporidium parvum Detection Methodologies*. Awwa. Awwa Research Foundation and American Water Works Association.
- Jex, A. R., Smith, H., Monis, P., Campbell, B., Gasser, R. (2008). *Cryptosporidium*--biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26(4), 304–17.
- Jex, A. R., Gasser, R. B. (2010). Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies research review. *Biotechnology*

- Advances*, 28(1), 17–26.
- Jiang, J., Xiao, L. (2003). An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50(Suppl), 542–547.
- Joachim, A., Eckert, E., Petry, F., Bialek, R., Dauschies, A. (2003). Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. *Veterinary Parasitology*, 111(1), 47–57.
- Johnson, D. W., Pieniazek, N. J., Griffin, D. W., Misener, L., Rose, J. B. (1995). Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 3849–3855.
- Johnson, J., Buddle, R., Reid, S., Armson, A., Ryan, U. M. (2008). Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Experimental Parasitology*, 119(3), 418–21.
- Jokipii, L., Jokipii, A. M. (1986). Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*, 315(26), 1643–7.
- Karim, M. R., Wang, R., Yu, F., Li, T., Dong, H., Li, D. (2015). Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* from nonhuman primates kept in zoos in China: Geographical segregation and host-adaptation of assemblage B isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, 30, 82–88.
- Kehl, K. S., Cicirello, H., Havens, P. L. (1995). Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 416–418.
- Kennedy, G. A., Kreitner, G. L., Straffuss, A. C. (1977). Cryptosporidiosis in three pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(3), 348–50.
- Keshavarz, A., Haghighi, A., Athari, A., Kazemi, B., Abadi, A., Nazemalhosseini Mojarad, E. (2009). Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Veterinary Parasitology*, 160(3–4), 316–8.
- Khramtsov, N. V., Tilley, M., Blunt, D. S., Montelone, B. A., Upton, S. J. (1995). Cloning and analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a protein with homology to cytoplasmic form Hsp70. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(4), 416–22.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular. Evolution*, 16, 111–120.
- Kipper, M., Andretta, I., Monteiro, S. G., Lovatto, P. A., Lehnen, C. R. (2011). Meta-analysis of the effects of endoparasites on pig performance. *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 316–20.
- Kjos, S. a, Jenkins, M., Okhuysen, P. C., Chappell, C. L. (2005). Evaluation of Recombinant Oocyst Protein CP41 for Detection of *Cryptosporidium*- Specific Antibodies Evaluation of Recombinant Oocyst Protein CP41 for Detection of *Cryptosporidium*- Specific Antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(2), 268–272.

- Klein, P. (2008). Preventive and therapeutic efficacy of halofuginone-lactate against *Cryptosporidium parvum* in spontaneously infected calves: a centralised, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 177(3), 429–31.
- Klein, P., Kleinová, T., Volek, Z., Simůnek, J. (2008). Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 152(1–2), 53–9.
- Koehler, A. V, Whipp, M. J., Haydon, S. R., Gasser, R. B. (2014). *Cryptosporidium cuniculus*--new records in human and kangaroo in Australia. *Parasites & Vectors*, 7(1), 492.
- Koh, W., Clode, P. L., Monis, P., Thompson, R. C. A. (2013). Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasites & Vectors*, 6(1), 270.
- Koh, W., Thompson, A., Edwards, H., Monis, P., Clode, P. L. (2014). Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BMC Microbiology*, 14, 281.
- Kohli, A., Bushen, O. Y., Pinkerton, R. C., Houpt, E., Newman, R. D., Sears, C. L. (2008). *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(7), 718–725.
- Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382(9888), 209–22.
- Kraft, M. R., Klotz, C., Bücker, R., Schulzke, J.-D., Aebischer, T. (2017). *Giardia's* Epithelial Cell Interaction In Vitro: Mimicking Asymptomatic Infection? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(September), 1–13.
- Kurniawan, A., Dwintasari, S. W., Connelly, L., Nichols, R. A. B., Yuniastuti, E., Karyadi, T., Djauzi, S. (2013). Annals of Epidemiology *Cryptosporidium* species from human immunodeficiency infected patients with chronic diarrhea in Jakarta, Indonesia. *Annals of Epidemiology*, 23(11), 720–723.
- Kváč, M., Kouba, M., Vítovec, J. (2006). Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 137(3–4), 202–9.
- Kváč, M., Sak, B., Kvetonová, D., Ditrich, O., Hofmannová, L., Modrý, D. (2008). Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Veterinary Parasitology*, 153(3–4), 363–7.
- Kváč, M., Hanzlíková, D., Sak, B., Květoňová, D. (2009). Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 160(3–4), 319–322.
- Kváč, M., Hromadová, N., Květoňová, D., Rost, M., Sak, B. (2011). Molecular

- characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), 378–82.
- Kvác, M., Kestřánová, M., Pinková, M., Květoňová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P. (2013). *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol*, 191(3–4), 218–227.
- Kváč, M., McEvoy, J., Loudová, M., Stenger, B., Sak, B., Květoňová, D. (2013). Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology*, 43(10), 805–17.
- Kváč, M., Hofmannová, L., Hlásková, L., Květoňová, D., Vítovec, J., McEvoy, J., Sak, B. (2014). *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*, 201(1–2), 9–17.
- Kváč, M., Němejč, K., Kestřánová, M., Květoňová, D., Wagnerová, P., Kotková, M. (2014). Age related susceptibility of pigs to *Cryptosporidium scrofarum* infection. *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 330–334.
- Kváč, M., Havrdová, N., Hlásková, L., Daňková, T., Kanděra, J., Ježková, J. (2016). *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS ONE*, 11(1), 1–24.
- LaGier, M. J., Zhu, G., Keithly, J. S. (2001). Characterization of a heavy metal ATPase from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Gene*, 266(1–2), 25–34.
- LaGier, M. J., Keithly, J. S., Zhu, G. (2002). Characterisation of a novel transporter from *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*, 32(7), 877–887.
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Cacciò, S. M. (2005). Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 207–213.
- Lallemant, M., Villeneuve, A., Belda, J., Dubreuil, P. (2006). Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinate in the treatment of cryptosporidiosis in veal calves. *The Veterinary Record*, 159(20), 672–6.
- Langer, R. C., Riggs, M. W. (1999). *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 67(10), 5282–5291.
- Lazarus, R. P., Ajjampur, S. S. R., Sarkar, R., Geetha, J. C., Prabakaran, A. D., Velusamy, V. (2015). Serum anti-cryptosporidial gp15 antibodies in mothers and children less than 2 years of age in India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 931–938.
- Leander, B. S., Clopton, R. E., Keeling, P. J. (2003). Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 1), 345–54.
- Learmonth, J. J., Ionas, G., Ebbett, K. A., Kwan, S., Kwan, E. S. (2004). Genetic

- Characterization and Transmission Cycles of *Cryptosporidium* Species Isolated from Humans in New Zealand Genetic Characterization and Transmission Cycles of *Cryptosporidium* Species Isolated from Humans in New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3973–3978.
- Lebbad, M., Ankarklev, J., Tellez, A., Leiva, B., Andersson, J. O., Svärd, S. (2008). Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Tropica*, 106(1), 44–53.
- Lefay, D., Naciri, P., Poirier, R., Chemette, R. (2001). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *Veterinary Record*, 148, 108–112.
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Díaz, S., McLauchlin, J. (2006). Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, 55(6), 703–707.
- Leoni, F., Gómez-Couso, H., Ares-Mazás, M. E., McLauchlin, J. (2007). Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* in naturally contaminated bivalve molluscs. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2430–2437.
- Levine, N. D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of Parasitology*, 66(5), 830–4.
- Li, N., Xiao, L., Cama, V. A., Ortega, Y., Gilman, R. H., Guo, M., Feng, Y. (2013). Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), 1573–82.
- Li, N., Xiao, L., Alderisio, K., Elwin, K., Cebelinski, E., Chalmers, R. (2014). Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2), 217–224.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W580–4. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv279>
- Liljeqvist, S., Ståhl, S. (1999). Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *Journal of Biotechnology*, 73(1), 1–33.
- Lim, Y. A. L., Iqbal, A., Surin, J., Sim, B. L. H., Jex, A. R., Nolan, M. J. (2011). First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV / AIDS patients in Malaysia. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 968–974.
- Lin, Q., Wang, X., Chen, J., Ding, L., Zhao, G. (2015). *Cryptosporidium suis* Infection in Post-Weaned and Adult Pigs in Shaanxi Province, Northwestern China. *Korean J Parasitol*, 53(1), 113–117.
- Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Hoerr, F. J., Giambrone, J. J. (1987). Experimental *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens and turkeys produced by ocular inoculation of oocysts. *Avian Diseases*, 31(2), 355–7.
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R., Blagburn, B. L. (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(1), 91–95.

- Liu, K., Zai, D., Zhang, D., Wei, Q., Han, G., Gao, H., Huang, B. (2010). Divalent Cp15-23 vaccine enhances immune responses and protection against *Cryptosporidium parvum* infection. *Parasite Immunology*, 32(5), 335–344.
- Liu, H., Shen, Y., Yin, J., Yuan, Z., Jiang, Y., Xu, Y. (2014). Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in china. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 25.
- Llorente, M. T., Clavel, A., Goñi, M. P., Varea, M., Seral, C., Becerril, R. (2007). Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International*, 56(3), 201–5.
- Londoño, Á. L., Mejía, S., Gómez-Marín, J. E. (2009). Prevalencia y factores de riesgo asociados a parasitismo intestinal en preescolares de zona urbana en Calarcá, Colombia. *Revista de Salud Publica*, 11(1), 72–81.
- López-Díaz de Cerio, A., Lasarte, J. J., Casares, N., Sarobe, P., Ruiz, M., Prieto, J., Borrás-Cuesta, F. (2003). Engineering Th determinants for efficient priming of humoral and cytotoxic T cell responses. *International Immunology*, 15(6), 691–699.
- Lora-suarez, F., Marin-vasquez, C., Loango, N., Gallego, M., Torres, E., Gonzalez, M. M. (2002). Giardiasis in children living in post-earthquake camps from Armenia (Colombia). *BMC Public Health*, 6, 1–6.
- Lorenzo Lorenzo, M. J., Ares-Mazás, E., Villacorta Martínez de Maturana, I. (1993). Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*, 47(1–2), 9–15.
- Lowery, C. J., Millar, B. C., Moore, J. E., Xu, J., Xiao, L., Rooney, P. J. (1998). Molecular genotyping of human cryptosporidiosis in Northern Ireland: epidemiological aspects and review ly higher infection rate in rural populations in comparison to. *Irish Journal of Medical Scienc*, 170(4), 246–250.
- Lucio-Forster, A., Griffiths, J. K., Cama, V. A., Xiao, L., Bowman, D. D. (2010). Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*, 26(4), 174–9.
- Luna, D. M., Camacho, L., Rojas, D., Bayona, M. (2010). Frecuencia de enteroparásitos en jardines infantiles aledaños a la cuenca baja del río Tunjuelito. *Revista U.D.C.A Actualización & Divulgación Científica*, 13(1), 7–15.
- Ma, J., Li, P., Zhao, X., Xu, H., Wu, W., Wang, Y. (2014). Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bienensei* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. *Veterinary Parasitology*, 207(2–4), 220–7.
- Ma, P., Soave, R. (1983). Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis*, 147(5), 824–828.
- Mac Kenzie, W., Hoxie, N., Proctor, M., Gradus, M., Blair, K., Peterson, D (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 331(3), 161–167.
- Maddox-Hyttel, C., Langkjaer, R. B., Enemark, H. L., Vigre, H. (2006). *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs--occurrence and



- management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, 141(1–2), 48–59.
- Maikai, B. V., Umoh, J. U., Kwaga, J. K. P., Maikai, V. A., Egege, S. C. (2009). Prevalence and risk factors associated with faecal shedding of *Cryptosporidium* oocysts in piglets, Kaduna, Nigeria. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 1(1), 1–4.
- Maikai, B. V., Umoh, J. U., Kwaga, J. K. P., Lawal, I. A., Maikai, V. A., Cama, V., Xiao, L. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Veterinary Parasitology*, 178(3–4), 241–5.
- Maikai, B. V., Umoh, J. U., Lawal, I. a, Kudi, A. C., Ejembi, C. L., & Xiao, L. (2012). Molecular characterizations of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* in humans in Kaduna State, Nigeria. *Experimental Parasitology*, 131(4), 452–6.
- Mallon, M. E., MacLeod, A., Wastling, J. M., Smith, H., Tait, A. (2003). Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(3), 207–218.
- Mancassola, R., Richard, A., Naciri, M. (1997). Evaluation of decoquinat to treat experimental cryptosporidiosis in kids. *Veterinary Parasitology*, 69(1–2), 31–37.
- Manrique-Abril, F. G., Billon Y Tigne, D., Bello, S. E., Ospina, J. M. (2006). Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 8(1), 88–97.
- Manzoor, S., Debnath, C., Kumar, A., Xiao, L. (2010). Veterinary Parasitology Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology*, 171(1–2), 41–47.
- Martínez-Ruiz, R., de Lucio, A., Fuentes, I., Carmena, D. (2016). Autochthonous *Cryptosporidium* cuniculus infection in Spain: First report in a symptomatic paediatric patient from Madrid. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(8), 532–534.
- Mascaró, C., Arnedo, T., Rosales, M. J. (1994). Respiratory cryptosporidiosis in a bovine. *The Journal of Parasitology*, 80(2), 334–6.
- McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Roger Couturier, M., Humphries, R. M. (2014). Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 712–720.
- McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Díaz, S., Nichols, G. L. (2000). Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 Fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 3984–3990.
- McNabb, S. J. N., Hensel, D. M., Welch, D. F., Heijbel, H., McKee, G. L., Istre, G. R. (1985). Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(4), 587–589.
- McNair, N. N., Mead, J. R. (2013). CD4<sup>+</sup> effector and memory cell populations protect against *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection / Institut*

- Pasteur*, 15(8–9), 599–606.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), 597–600.
- Mead, J. R., Arrowood, M. J., Sterling, C. R. (1988). Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. *The Journal of Parasitology*, 74(1), 135–43.
- Mead, J. R. (2014). Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(6), 1505–1513.
- Meamar, A. R., Guyot, K., Certad, G., Dei-Cas, E., Mohraz, M., Mohebbi, M. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 1033–1035.
- Medina, A., García, G., Galván, A., Botero, J. (2009). Prevalencia de parásitos intestinales en niños que asisten al Templo Comedor Sagrado Corazón Teresa Benedicta de la Cruz, del barrio Vallejuelos, Medellín, 2007. *Iatreia*, 22(3), 227–234.
- Meganck, V., Hoflack, G., Piepers, S., Opsomer, G. (2015). Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(1), 64–70.
- Meireles, M. V. (2010). *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(4), 197–204.
- Meireles, M. V., Oliveira, F. P. De, Teixeira, W. F., Coelho, W., Mendes, L. C. N. (2011). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology Research*, 109(3), 949–951.
- Meisel, J. L., Perera, D. R., Meligro, C., Rubin, C. E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70(6), 1156–1160.
- Menzies, F. M., Machphail, D., Henriquez, F. L. (2016). The role of chemokines and their receptors during protist parasite infections. *Parasitology*, 143(14), 1890–1901.
- Mercado, R., Buck, G. A., Manque, P. A., & Ozaki, L. S. (2007). *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 462–464.
- Mercado, R., Peña, S., Ozaki, L. S., Fredes, F., Godoy, J. (2015). Multiple *Cryptosporidium parvum* subtypes detected in a unique isolate of a Chilean neonatal calf with diarrhea. *Parasitology Research*, 114(5), 1985–1988.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149.
- Mi, R.-S., Chen, Z.-G., Yue, C., Yu, H.-Z., Xue, F.-M., Yu, Y.-L., Lin, J.-J. (2007). Cloning and Sequence Analysis of the *Cryptosporidium parvum* CP15 Gene. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 15(3).

- Ministerio de Salud de Colombia. Resolución Número 8430 de 1993 (1993). Colombia.
- Minvielle, M. C., Molina, N. B., Polverino, D., Basualdo, J. A. (2008). First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 98–103.
- Misic, Z., Katic-Radiojevic, S., Kulisic, Z. (2003). *Cryptosporidium* infection in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the belgrade district. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 53(5–6), 361–366.
- Misic, Z., Abe, N. (2007). Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology*, 134(Pt 3), 351–8.
- Molloy, S. F., Smith, H. V., Kirwan, P., Nichols, R. A. B., Asaolu, S. O., Connelly, L., Holland, C. V. (2010). Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 608–613.
- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G., Ey, P. L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9), 1135–1144. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026204>
- Montaño, J. S., Avendaño, C. (2012). Contribución al conocimiento de la epidemiología de la criptosporidiosis bovina en el Valle de Chiquinquirá. *Revista U.D.C.A Actualización & Divulgación Científica*, 15(2), 391–398.
- Moody, M. A. (2013). Chapter 95. Microbial Vaccine Development. In *Genomic and Personalized Medicine* (Second Edi, pp. 1119–1128). Elsevier Inc.
- Moon, H. W., Bemrick, W. J. (1981). Fecal Transmission of Calf Cryptosporidia between Calves and Pigs. *Veterinary Pathology*, 18(2), 248–255.
- Moore, C. E., Elwin, K., Phot, N., Seng, C., Mao, S., Suy, K. (2016). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Species and *Giardia duodenalis* from Symptomatic Cambodian Children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), e0004822.
- Morgan, U. M., Pallant, L., Dwyer, B. W., Forbes, D. A., Rich, G., Thompson, R. C. A. (1998). Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: Clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 995–998.
- Morgan, U. M., Xiao, L., Fayer, R., Lal, A. A., Thompson, R. C. (1999). Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology*, 29(11), 1733–51.
- Morgan, U., Weber, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Thompson, C. A., Ndiritu, W. (2000). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates Obtained from Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Living in Switzerland, Kenya and the United States Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates Obtained from Human Immunod. *Society*, 38(3), 1180–1183.
- Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. a., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R. (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(6), 433–440.

- Morrison, L. J., Mallon, M. E., Smith, H. V., MacLeod, A., Xiao, L., Tait, A. (2008). The population structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Scotland: a complex picture. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(2), 121–9.
- Morse, T. D., Nichols, R. A. B., Grimason, A. M., Tembo, K. C., Smith, H. V. (2003). Incidence of *Cryptosporidium* species in paediatric patients in Malawi. In *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene in Scotland Meeting at the Colville Building, University of Strathclyde, Glasgow, 21 May 2003 Poster presentations* (pp. 622–624).
- Murakoshi, F., Xiao, L., Matsubara, R., Sato, R., Kato, Y., Sasaki, T. (2012). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in grazing beef cattle in Japan. *Veterinary Parasitology*, 187(1–2), 123–8.
- Nassir, A., Avais, M., Khan, M., Ahmad, N. (2009). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Lahore (Pakistan) and its association with diarrhea in dairy calves. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11(1), 221–224.
- National Research Council of the National Academies. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (National Academy of Sciences, Ed.) (Eighth Ed.).
- Navarro-I-Martinez, L., Da Silva, A. J., Botero Garces, J. H., Montoya Palacio, M. N., Del Aguila, C., Bornay-Llinares, F. J. (2006). Cryptosporidiosis in HIV-positive patients from Medellín, Colombia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(SUPPL. 1), 37–39.
- Navarro-i-Martinez, L., Del Águila, C., Bornay-Llinares, F. J. (2011). *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(2), 135–43.
- Nazemalhosseini-Mojarad, E., Haghighi, A., Taghipour, N., Keshavarz, A., Mohebi, S. R., Zali, M. R., Xiao, L. (2011). Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology*, 179(1–3), 250–2.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press, New York.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., Upton, S. J. (1995). A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. *Microbios*, 83(335), 77–88.
- Nesterenko, M. V., Woods, K., Upton, S. J. (1999). Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1454(2), 165–173.
- Ng, J., MacKenzie, B., Ryan, U. (2010). Longitudinal multi-locus molecular characterisation of sporadic Australian human clinical cases of cryptosporidiosis from 2005 to 2008. *Experimental Parasitology*, 125(4), 348–356.
- Ng, J. S. Y., Pingault, N., Gibbs, R., Koehler, A., Ryan, U. (2010). Experimental Parasitology Molecular characterisation of *Cryptosporidium* outbreaks in Western and South Australia. *Experimental Parasitology*, 125(4), 325–328.
- Ng, J. S. Y., Eastwood, K., Walker, B., Durrheim, D. N., Massey, P. D., Porigneaux, P. (2012). Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in

- northern New South Wales. *Experimental Parasitology*, 130(4), 437–441.
- Nguyen, S. T., Nguyen, D. T., Le, D. Q., Le Hua, L. N., Van Nguyen, T., Honma, H., Nakai, Y. (2007). Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. in cattle in central Viet Nam. *Veterinary Parasitology*, 150(4), 357–61.
- Nguyen, S. T., Fukuda, Y., Tada, C., Sato, R., Huynh, V. V., Nguyen, D. T., Nakai, Y. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* in pigs in central Vietnam. *Parasitology Research*, 112(1), 187–192.
- Nichols, G. (2008). Epidemiology. In Fayer, R. Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (Second edi, pp. 79–118). Boca Ratón, Florida.
- Nichols, R. A. B., Campbell, B. M., Smith, H. V. (2006). Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5428–5435.
- Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., Yardley, J. H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70(4), 592–598.
- Nydam, D. V, Wade, S. E., Schaaf, S. L., Mohammed, H. O. (2001). Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research*, 62(10), 1612–1615.
- Nydam, D. V, Mohammed, H. O. (2005). Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* species infection in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3932–43.
- O'Brien, C., Flower, D. R., Feighery, C. (2008). Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Research*, 4(1), 1–7.
- O'Brien, E., McInnes, L., Ryan, U. (2008). *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Experimental Parasitology*, 118(1), 118–21.
- O'Connor, R. M., Wanyiri, J. W., Cevallos, A. M., Priest, J. W., Ward, H. D. (2007). *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(1), 80–83.
- O'Connor, R. M., Burns, P. B., Ha-Ngoc, T., Scarpato, K., Khan, W., Kang, G., Ward, H. (2009). Polymorphic mucin antigens CpMuc4 and CpMuc5 are integral to *Cryptosporidium parvum* infection in vitro. *Eukaryotic Cell*, 8(4), 461–469.
- O'Donoghue, P. (1995). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. *International Journal for Parasitology*, 25(2), 139–195.
- O'Hara, S. P., Yu, J.-R., Lin, J. J.-C. (2004). A novel *Cryptosporidium parvum* antigen, CP2, preferentially associates with membranous structures. *Parasitology Research*, 92(4), 317–27.
- Ocampo, R. J., Rivera, F. A., López, G. A., Álvarez, M. E., Cardozo, L. A., Pérez, J. E. (2012). Primer reporte de *Cryptosporidium parvum* en terneros hostein (Bos Taurus) de Manizales, Caldas, Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 59(3), 159–164.
- Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Kettner, C., Sterling, C. R. (1996). *Cryptosporidium*

- parvum* metalloaminopeptidase inhibitors prevent in vitro excystation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(12), 2781–2784.
- Okhuysen, P. C., Chappell, C. L. (2002). *Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet? *International Journal for Parasitology*, 32(5), 517–25.
- Olsen, L., Åkesson, C. P., Storset, A. K., Lacroix-Lamandé, S., Boysen, P., Metton, C. (2015). The early intestinal immune response in experimental neonatal ovine cryptosporidiosis is characterized by an increased frequency of perforin expressing NCR1+ NK cells and by NCR1– CD8+ cell recruitment. *Veterinary Research*, 46(28), 1–17.
- Omoruyi, B. E., Nwodo, U. U., Udem, C. S., Okonkwo, F. O. (2014). Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. *Molecules*, 19(2), 2674–2683.
- Ong, C. S. L., Eisler, D. L., Goh, S. H., Tomblin, J., Awad-El-Kariem, F. M., Beard, C. B. (1999). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis outbreaks and transmission in British Columbia, Canada. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(1), 63–69.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2011). *Guidelines for Drinking-Water Quality* (4th edition). Switzerland: WHO. Retrieved from [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf)
- Ortega-Pierres, M. G., Jex, A. R., Ansell, B. R., Svärd, S. G. (2017). Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Tropica*, (July).
- Ortega, T. M., Vergara, A., Guimbao, J., Clavel, A., Gavín, P., Ruiz, A. (2006). Brote de diarrea y transmisión de *Cryptosporidium hominis* asociados al uso de pañal en niños. *Medicina Clínica*, 127(17), 653–656.
- Ortega, Y., Sheehy, R., Cama, V., Oishi, K., Sterling, C. (1991). Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. *J Protozool*, 36(6), 40S–41S.
- Ortega, Y., Charles, M., Sterling, R., Robert, P., Gilman, M., Vitalino, A. (1993). *Cyclospora* species--a new protozoan pathogen of humans. *The New England Journal of Medicine*, 328(18), 1308–1312.
- Pacheco, F. T. F., Silva, R. K. N. R., Martins, A. S., Oliveira, R. R., Alcântara-Neves, N. M., Silva, M. P. (2013). Differences in the detection of *Cryptosporidium* and *Isospora* (Cystoisospora) oocysts according to the fecal concentration or staining method used in a clinical laboratory. *The Journal of Parasitology*, 99(6), 1002–8.
- Painter, J. E., Gargano, J. W., Yoder, J. S., Collier, S. A., Hlavsa, M. C. (2016). Evolving epidemiology of reported cryptosporidiosis cases in the United States, 1995-2012. *Epidemiology and Infection*, 144(8), 1792–802.
- Palkovic, L., Marousek, V. (1989). The pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 and *C. Baileyi* Current, Upton et Haynes, 1986 for chickens. *Folia Parasitologica*, 36(3), 209–17.
- Panciera, R. J., Thomassen, R. W., Garner, F. M. (1971). Cryptosporidial Infection in a Calf. *Veterinary Pathology Online*, 8(5–6), 479–484.
- Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. (2007). AVMA

*Guidelines on Euthanasia.*

- Pantenburg, B., Cabada, M. M., White, A. C. (2009). Treatment of cryptosporidiosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(4), 385–91.
- Pantenburg, B., Dann, S. M., Wang, H. C., Robinson, P., Castellanos-Gonzalez, A., Lewis, D. E., White, A. C. (2008). Intestinal immune response to human *Cryptosporidium* sp. infection. *Infection and Immunity*, 76(1), 23–29.
- Pardo, D., Oliver, O. (2012). Identificación de agentes infecciosos asociados con Diarrea Neonatal Bovina en la Sabana de Bogotá Identification of infectious agents associated with Bovine Neonatal Diarrhea in the Sabana de Bogotá. *MVZ Córdoba*, 17(3), 3162–3168.
- Pasquali, P., Fayer, R., Zarlenga, D., Canals, A., Marez, T. De, Gomez Munoz, M. T. (2006). Recombinant bovine interleukin-12 stimulates a gut immune response but does not provide resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 135(3–4), 259–68.
- Patarroyo, M. E., Cifuentes, G., Bermúdez, A., Patarroyo, M. A. (2008). Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically synthesized anti-malarial vaccines. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5B), 1915–1935.
- Paz e Silva, F., Souza, R., Joao, A.-J. (2013). Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 22(1), 22–28.
- Peeters, J. E., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vandergheynst, D., Naciri, M., Aresmazas, E., Yvone, P. (1992). *Cryptosporidium-Parvum* in Calves - Kinetics and Immunoblot Analysis of Specific Serum and Local Antibody-Responses (Immunoglobulin a [Iga], Igg, and Igm) after Natural and Experimental Infections. *Infection and Immunity*, 60(6), 2309–2316.
- Peng, M. M., Xiao, L., Freeman, A. R., Arrowood, M. J., Escalante, A. A., Weltman, A. C. (1997). Genetic Polymorphism among *Cryptosporidium parvum* Isolates: Evidence of Two Distinct Human Transmission Cycles. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), 567–573.
- Perkins, M. E., Riojas, Y. A., Wu, T. W., Le Blancq, S. M. (1999). CpABC, a *Cryptosporidium parvum* ATP-binding cassette protein at the host-parasite boundary in intracellular stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5734–5739.
- Perryman, L. E., Jasmer, D. P., Riggs, M. W., Bohnet, S. G., McGuire, T. C., Arrowood, M. J. (1996). A cloned gene of *Cryptosporidium parvum* encodes neutralization-sensitive epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 80(2), 137–147.
- Perryman, L. E., Kapil, S. J., Jones, M. L., Hunt, E. L. (1999). Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine*, 17(17), 2142–9.
- Petersen, C., Gut, J., Doyle, P. S., Crabb, J. H., Nelson, R. G., Leech, J. H. (1992). Characterization of a >900,000-Mr *Cryptosporidium parvum* Sporozoite Glycoprotein Recognized by Protective Hyperimmune Bovine Colostral Immunoglobulin. *Infection and Immunity*, 60(12), 5132–5138.

- Petersen, C., Gut, J., Leech, J. H., Nelson, R. G. (1992). Identification and initial characterization of five *Cryptosporidium parvum* sporozoite antigen genes. *Infection and Immunity*, 60(6), 2343–8.
- Petersen, H. H., Jianmin, W., Katakam, K. K., Mejer, H., Thamsborg, S. M., Dalsgaard, A. (2015). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Danish organic pig farms: Seasonal and age-related variation in prevalence, infection intensity and species/genotypes. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2), 29-39.
- Petry, F., Jakobi, V., Tessema, T. S. (2010). Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Experimental Parasitology*, 126(3), 304–9.
- Pieniazek, N. J., Bornay-Llinares, F. J., Slemenda, S. B., Da Silva, A. J., Moura, I. N. S., Arrowood, M. J. (1999). New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), 444–449.
- Plumb, D. C. (2005). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. (Fifth Edit).
- Plutzer, J., Karanis, P. (2007). Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 146(3–4), 357–62.
- Plutzer, J., Karanis, P. (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, 165(3–4), 187–99.
- Pollock, K. G. J., Tement, H. E., Mellor, D. J., Chalmers, R. M., Smith, H. V., Ramsay, C. N., Innocent, G. T. (2010). Spatial and temporal epidemiology of sporadic human cryptosporidiosis in Scotland. *Zoonoses and Public Health*, 57(7–8), 487–492.
- Pollok, R. C. G., McDonald, V., Kelly, P., Farthing, M. J. G. (2003). The role of *Cryptosporidium parvum*-derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. *Parasitology Research*, 90(3), 181–186.
- Potters, I., Esbroeck, M. Van. (2010). Negative Staining Technique of Heine for the Detection of *Cryptosporidium* spp.: A Fast and Simple Screening Technique. *The Open Parasitology Journal*, 4(1), 1–4.
- Power, M. L., Ryan, U. M. (2008). A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *The Journal of Parasitology*, 94(5), 1114–1117.
- Preidis, G., Wang, H. C., Lewis, D. E., Castellanos-Gonzalez, A., Rogers, K., Graviss, E. (2007). Seropositive human subjects produce interferon gamma after stimulation with recombinant *Cryptosporidium hominis* gp15. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3), 583–585.
- Prieto, I., Hervás-Stubbs, S., García-Granero, M., Berasain, C., Riezu-Boj, J. I., Lasarte, J. J. (1995). Simple strategy to induce antibodies of distinct specificity: application to the mapping of gp120 and inhibition of HIV-1 infectivity. *European Journal of Immunology*, 25(4), 877–83.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Puiu, D., Enomoto, S., Buck, G. A., Abrahamsen, M. S., Kissinger, J. C. (2004). CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic Acids Research*,



- 32(Database issue), D329-31.
- Pulido-Medellín, M. O., Andrade-Becerra, R. J., Iván Rodríguez-Vivas, R., García-Corredor, D. J. (2014). Prevalencia y posibles factores de riesgo en la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en bovinos de Boyacá, Colombia. Prevalence and possible risk factors for *Cryptosporidium* spp oocyst excretion in dairy cattle in Boyacá, Colombia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(3), 357–364.
- Putignani, L., Possenti, A., Cherchi, S., Pozio, E., Crisanti, A., Spano, F. (2008). The thrombospondin-related protein CpMIC1 (CpTSP8) belongs to the repertoire of micronemal proteins of *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157(1), 98–101.
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., Del Cacho, E., López-Bernad, F. (1996). Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Veterinary Parasitology*, 67(1–2), 75–81.
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Del Cacho, E., Clavel, A., López-Bernad, F. (1996). Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet Parasitol*, 67(1–2), 83–88.
- Quílez, J., Torres, E., Chalmers, R. M., Robinson, G., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C. (2008). *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology*, 135(14), 1613–1620.
- Quílez, J., Vergara-Castiblanco, C., Monteagudo, L., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C. (2011). Multilocus fragment typing and genetic structure of *Cryptosporidium parvum* Isolates from diarrheic preweaned calves in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7779–86.
- Quílez, J., Vergara-Castiblanco, C., Monteagudo, L., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C. (2013). Host association of *Cryptosporidium parvum* populations infecting domestic ruminants in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5363–5371.
- Quílez, J., Hadfield, S. J., Ramo, A., Vergara-Castiblanco, C., Chalmers, R. M. (2014). Validation of fragment analysis by capillary electrophoresis to resolve mixed infections by *Cryptosporidium parvum* subpopulations. *Parasitology Research*, 113(5), 1821–5.
- R Development Core Team. (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: The R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.r-project.org/>.
- Ramírez, J. D., Heredia, R. D., Hernández, C., León, C. M., Moncada, L. I., Reyes, P. (2015). Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 208–213.
- Ramo, A., Quílez, J., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C. (2014). Optimization of a fragment size analysis tool for identification of *Cryptosporidium* species and Gp60 alleles infecting domestic ruminants. *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), 466–71.

- Ramo, A., Quílez, J., Vergara-Castiblanco, C., Monteagudo, L., Del Cacho, E., Clavel, A. (2015). Multilocus typing and population structure of *Cryptosporidium* from children in Zaragoza, Spain. *Infection, Genetics and Evolution*, 31, 190–197.
- Ramo, A., Monteagudo, L. V., Del Cacho, E., Sánchez-acedo, C., Quílez, J. (2016). Intra-Species Genetic Diversity and Clonal Structure of *Cryptosporidium parvum* in Sheep Farms in a Confined Geographical Area in Northeastern Spain. *PLoS One*, 11(5), e0155336.
- Ramo, A., Quílez, J., Monteagudo, L., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C. (2016). Intra-species diversity and panmictic structure of *Cryptosporidium parvum* populations in cattle farms in Northern Spain. *PLoS ONE*, 11(2), 1–16.
- Ramo, A., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C., Quílez, J. (2017). Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. *Science of the Total Environment*, 598, 628–638.
- Rašková, V., Květoňová, D., Sak, B., McEvoy, J., Edwinston, A., Stenger, B., Kváč, M. (2013). Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 360–362.
- Reis Sousa, C. (2001). Dendritic Cells Minireview as Sensors of Infection. *Immunity*, 14, 495–498.
- Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R. (2012). *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130(3), 274–81.
- Reperant, J. M., Naciri, M., Chardes, T., Bout, D. T. (1992). Immunological characterization of a 17-kDa antigen from *Cryptosporidium parvum* recognized early by mucosal IgA antibodies. *FEMS Microbiology Letters*, 78(1), 7–14.
- Rider, S. D., Zhu, G. (2010). *Cryptosporidium*: genomic and biochemical features. *Experimental Parasitology*, 124(1), 2–9.
- Rieux, A., Paraud, C., Pors, I., Chartier, C. (2014). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 171–179.
- Riggs, M. W., McGuire, T. C., Mason, P. H., Perryman, L. E. (1989). Neutralization-sensitive epitopes are exposed on the surface of infectious *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(4), 1340–5.
- Riggs, M., Stone, A., Yount, P., Langer, R., Arrowood, M. . (1997). Protective monoclonal antibody defines a circum- sporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *The Journal of Immunology*, 158(4), 1787–1795.
- Riggs, M. W. (2002). Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 4(10), 1067–80.
- Robertson, L. J., Chalmers, R. M. (2013). Foodborne cryptosporidiosis: Is there really more in Nordic countries? *Trends in Parasitology*, 29(1), 3–9.

- Robinson, G., Wright, S., Elwin, K., Hadfield, S. J., Katzer, F., Bartley, P. M. (2010). Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 40(13), 1539–1548.
- Robinson, G., Chalmers, R. M. (2012). Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Experimental Parasitology*, 132(2), 200–15.
- Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M., Mark, A. E. (2002). Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12179–12184.
- Rodriguez-Rivera, L. D., Cummings, K. J., McNeely, I., Suchodolski, J. S., Scorza, A. V., Lappin, M. R. (2016). Prevalence and Diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* Identified Among Feral Pigs in Texas. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(12), 765–768.
- Rodríguez, D. C., Pino, N., Peñuela, G. (2012). Science of the Total Environment Microbiological quality indicators in waters of dairy farms : Detection of pathogens by PCR in real time. *Science of the Total Environment*, 427–428, 314–318.
- Rodríguez, V., Espinosa, O., Carranza, J. C., Duque, S., Arévalo, A., Clavijo, J. A. (2014). *Giardia duodenalis* genotypes found in the Instituto Colombiano de Bienestar Familiar day care centers and dogs in Ibagué, Colombia. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 34(2), 271–281.
- Rosado-García, F. M., Guerrero-Flórez, M., Karanis, G., Hinojosa, M. D. C., Karanis, P. (2017). Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(5), 783–798.
- Rossignol, J.-F. (2010). *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Experimental Parasitology*, 124(1), 45–53.
- Rossle, N. F., Latif, B. (2013). Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(11), 916–924.
- Ryan, U. M., Monis, P., Enemark, H. L., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R. (2004). *Cryptosporidium suis* n. sp. (apicomplexa: cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol*, 90(4), 769–773.
- Ryan, U. M., Power, M., Xiao, L. (2008). *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(1), 22–26.
- Ryan, U., Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), 943–956.
- Ryan, U. N. A., Fayer, R., Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals : current understanding and research needs. *Parasitology*, 14(13), 1667–1685.
- Ryan, U., Hijjawi, N. (2015). New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal for Parasitology*, 45(6), 367–373.

- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., Hijjawi, N. (2016). It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*, 105(Noviembre), 305–313.
- Ryan, U., Zahedi, A., Paparini, A. (2016). *Cryptosporidium* in Humans and Animals - a One Health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology*, 38(9), 535–547.
- Rzeżutka, A., Kaupke, A. (2013). Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* species isolated from cattle in Poland. *Veterinary Parasitology*, 196(3–4), 301–6.
- Sagodira, S., Buzoni-Gatel, D., lochmann, S., Naciri, M., Bout, D. (1999). Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine*, 17(19), 2346–55.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Samie, A, Bessong, P. O., Obi, C. L., Sevilleja, J. E. A. D., Stroup, S., Houpt, E., Guarrant, R. L. (2006). *Cryptosporidium* species: preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. *Experimental Parasitology*, 114(4), 314–22.
- Sánchez-Acedo, C., Fleta, J., Clavel, A., Parrilla, A., Quílez, J. (1991). Prevalencia de parasitación por *Cryptosporidium* spp. en diversas especies de animales. In / *Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental Europeas ICASEP* (p. 288). Valencia.
- Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, Á. (2017). Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–14.
- Sanford, S. E. (1987). Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981-1985). *J Am Vet Med Assoc*, 190(6), 695–698.
- Sanford, S. E., Josephson, G. K. (1982). Bovine Cryptosporidiosis: Clinical and Pathological Findings in Forty-two Scouring Neonatal Calves. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne*, 23(12), 343–347.
- Santín, M., Trout, J. M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122(2), 103–17.
- Santín, M., Trout, J. M., Vecino, J. A. C., Dubey, J. P., Fayer, R. (2006). *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Veterinary Parasitology*, 141(3–4), 334–9.
- Santín, M., Trout, J. M., Fayer, R. (2007). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Veterinary Parasitology*, 146(1–2), 17–24.
- Santín, M., Trout, J. M. (2008). Livestock. In Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (Second edi, pp. 451–483). Boca Raton. Florida: CRC Press.

- Santín, M., Trout, J. M., & Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155(1–2), 15–23.
- Santín, M., Zarlenga, D. S. (2009). A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. *Veterinary Parasitology*, 166(1–2), 32–7.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends in Parasitology*, 22(5), 203–210.
- Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M. S. (2008). Microbial adhesion of *Cryptosporidium parvum*: identification of a colostrum-derived inhibitory lipid. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 162(1), 32–9.
- Schubnell, F., von Ah, S., Graage, R., Sydler, T., Sidler, X., Hadorn, D., Basso, W. (2016). Occurrence, clinical involvement and zoonotic potential of endoparasites infecting Swiss pigs. *Parasitology International*, 65(6), 618–624.
- Sharma, P., Sharma, A., Sehgal, R., Malla, N., Khurana, S. (2013). International Journal of Infectious Diseases Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(8), e601–e605.
- Shrestha, R. D., Grinberg, A., Dukkupati, V. S. R., Pleydell, E. J., Prattley, D. J., French, N. P. (2014). Infections with multiple *Cryptosporidium* species and new genetic variants in young dairy calves on a farm located within a drinking water catchment area in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 287–91.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539.
- Silverlås, C., Emanuelson, U., de Verdier, K., Björkman, C. (2009). Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 90(3–4), 242–53.
- Silverlås, C., Näslund, K., Björkman, C., Mattsson, J. (2010). Veterinary Parasitology Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 289–295.
- Silverlås, C., Mattsson, J. G., Insulander, M., Lebbad, M. (2012). Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *International Journal for Parasitology*, 42(11), 963–967.
- Siuffi, M. I., Angulo, M. A., Velasco, C. A. A. L., López, P. Í. O., Dueñas, V. Í. H. U. G. O., Rojas, C. O. (2006). Relación entre los niveles de carga viral y los niveles de linfocitos CD4 en el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. en heces de niños de la Clínica Pediátrica de VIH / SIDA del Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia. *Colombia Médica*, 37(1), 15–20.
- Siwila, J., Phiri, I. G. K., Enemark, H. L., Nchito, M., Olsen, A. (2011). Seasonal prevalence and incidence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* and associated diarrhoea in children attending pre-school in Kafue, Zambia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(2), 102–

8.

- Siwila, J., Mwape, K. E. (2012). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in pigs in Lusaka, Zambia. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 79(1), E1-5.
- Slavin, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, 65(3), 262–6.
- Smith, A., Reacher, M., Smerdo, W., Adak, G., Nichols, G., Chalmers, R. (2006). Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5. *Epidemiology and Infection*, 134(6), 1141–1149.
- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Tait, A., McLauchlin, J., Thompson, R. C. A. (2006). Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology*, 22(4), 160–167.
- Smith, H. (2008). Diagnostic. In Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (Second edi, pp. 173–207). Boca Raton. Florida: CRC Press.
- Smith, H., Cook, N. (2009). Lessons learnt in development and application of detection methods for zoonotic foodborne protozoa on lettuce and fresh fruit. In A. Mortimer, P. Colonna, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle, & G. Barbosa- Cánovas (Eds.), *Global Issues in Food Science and Technology*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Snoeck, H. W., Lardon, F., Lenjou, M., Nys, G., Van Bockstaele, D. R., Peetermans, M. E. (1993). Interferon-gamma and interleukin-4 reciprocally regulate the production of monocytes/macrophages and neutrophils through a direct effect on committed monopotent bone marrow progenitor cells. *European Journal of Immunology*, 23(5), 1072–7.
- Šoba, B., Petrovec, M., Mioč, V., Logar, J. (2006). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 918–921.
- Souza, R. De, Rodrigues, M. A. M., Morceli, J., Kemp, R., Mendes, R. P. (2004). Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(2), 182–185.
- Spano, F., Putignani, L., Naitza, S., Puri, C., Wright, S., Crisanti, A. (1998). Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92(1), 147–162.
- Spano, F., Crisanti, A. (2000). *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *International Journal for Parasitology*, 30(4), 553–65. Retrieved from
- Sponseller, J. K., Griffiths, J. K., Tzipori, S. (2014). The evolution of respiratory Cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 575–86.
- Steele, M. I., Kuhls, T. L., Nida, K., Meka, C. S. R., Halabi, I. M., Mosier, D. A. (1995). A *Cryptosporidium parvum* genomic region encoding hemolytic activity. *Infection*

- and Immunity*, 63(10), 3840–3845.
- Sterling, C. R. (2000). Cryptosporidiosis: the treatment dilemma. *Journal of Medical Microbiology*, 49(3), 207–8.
- Stills, H. F. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 46(3), 280–293.
- Striepen, B. (2013). Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature*, 503, 8–10.
- Strong, W. B., Gut, J., Nelson, R. G. (2000). Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and Immunity*, 68(7), 4117–34.
- Sturbaum, G. D., Jost, B. H., Sterling, C. R. (2003). Nucleotide changes within three *Cryptosporidium parvum* surface protein encoding genes differentiate genotype I from genotype II isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 128(1), 87–90.
- Suárez-Luengas, L., Clavel, A., Quílez, J., Goñi-Cepero, M. P., Torres, E., Sánchez-Acedo, C., Del Cacho, E. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, 148(3–4), 231–5.
- Subgerencia Cultural del Banco de la República. (2015). Posición astronómica y geográfica de Colombia. Retrieved August 4, 2015, from [http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/ayudadetareas/geografia/posicion\\_astronomica\\_geografica\\_colombia#Como\\_citar\\_esto\\_texto](http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/ayudadetareas/geografia/posicion_astronomica_geografica_colombia#Como_citar_esto_texto)
- Sulaiman, I. M., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, C. B. (1998). Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 681–685.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M. (2003). Triosephosphate Isomerase Gen Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, 9(11), 1444–1452.
- Sulaiman, I., Hira, P., Zhou, L., Al-ali, F. M., Al-shelahi, F. A., Shweiki, H. M. (2005). Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2805–2809.
- Szczotka, A., Pejsak, Z. (2013). *Balantidium coli* in PMWS-suspected Pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 148(1), 82.
- Szonyi, B., Bordonaro, R., Wade, S. E., Mohammed, H. O. (2010). Seasonal variation in the prevalence and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* infection in dairy cattle in the New York City Watershed. *Parasitology Research*, 107(2), 317–25.
- Tabares, L. F., González, L. (2008). Prevalencia de parasitosis intestinales en niños menores de 12 años, hábitos higiénicos, características de las viviendas y presencia de bacterias en el agua en una vereda de Sabaneta, Antioquia, Colombia. *Iatreia*, 21(3), 253–259.

- Takashima, Y., Xuan, X., Kimata, I., Iseki, M., Kodama, Y., Nagane, N. (2003). Recombinant bovine herpesvirus-1 expressing p23 protein of *Cryptosporidium parvum* induces neutralizing antibodies in rabbits. *The Journal of Parasitology*, 89(2), 276–282.
- Tamer, G., Turk, M., Dagci, H., Pektas, B., Guy, E., Guruz, A., Uner, A. (2007). The prevalence of cryptosporidiosis in Turkish children, and genotyping of isolates by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Saudi Med J*, 28(8), 1243–1246.
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–26.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Tanriverdi, S., Widmer, G. (2006). Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(2), 113–122.
- Tessema, T. S., Dauber, E., Petry, F. (2009). Adoptive transfer of protective immunity from *Cryptosporidium parvum*-infected interferon-gamma and interleukin-12-deficient mice to naive recipients. *Vaccine*, 27(47), 6575–81.
- Thompson, H. P., Dooley, J. S. G., Kenny, J., McCoy, M., Lowery, C. J., Moore, J. E., Xiao, L. (2007). Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitology Research*, 100(3), 619–24.
- Thompson, R., Palmer, C., O’Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 177(1), 18–25.
- Thompson, R. C. A., Ash, A. (2016). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 315–323.
- Thompson, R. C. A., Koh, W. H., Clode, P. L. (2016). *Cryptosporidium* — What is it? *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 54–61.
- Thomson, S., Hamilton, C. A., Hope, J. C., Katzer, F., Mabbott, N. A., Morrison, L. J., Innes, E. A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48(1), 42.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J., Frankena, K. (2001). Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, 148(18), 567–572.
- Tiangtip, R., Jongwutiwes, S. (2002). Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Tropical Medicine and International Health*, 7(4), 357–364.
- Tilley, M., Fayer, R., Guidry, A., Upton, S. J., Blagburn, B. L. (1990). *Cryptosporidium parvum* (apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocyst and sporozoite antigens recognized by bovine colostral antibodies. *Infection and Immunity*, 58(9), 2966–2971.



- Tilley, M., Upton, S. J. (1990). Electrophoretic characterization of *Cryptosporidium parvum* (KSU-1 isolate) (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Canadian Journal of Zoology*, 68(7), 1513–1519.
- Tilley, M., Upton, S. J., Fayer, R., Barta, J. R., Chrisp, C. E., Freed, P. S. (1991). Identification of a 15-kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity*, 59(3), 1002–1007.
- Tilley, M., Upton, S. J. (1994). Both CP15 and CP25 are left as trails behind gliding sporozoites of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiology Letters*, 120(3), 275–8.
- Tomazic, M. L., Maidana, J., Dominguez, M., Uriarte, E. L., Galarza, R., Garro, C. (2013). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 198(3–4), 382–6.
- Tosini, F., Agnoli, A., Mele, R., Gomez Morales, M. A., Pozio, E. (2004). A new modular protein of *Cryptosporidium parvum*, with ricin B and LCCL domains, expressed in the sporozoite invasive stage. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(1), 137–147.
- Trasarti, E., Pizzi, E., Pozio, E., Tosini, F. (2007). The immunological selection of recombinant peptides from *Cryptosporidium parvum* reveals 14 proteins expressed at the sporozoite stage, 7 of which are conserved in other apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 152(2), 159–69.
- Triviño-Valencia, J., Lora, F., Zuluaga, J. D., Gomez-Marin, J. E. (2016). Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitology Research*, 115(5), 1789–1797.
- Trotz-Williams, L., Martin, D., Gatei, W., Cama, V., Peregrine, A., Martin, S. (2006). Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research*, 99(4), 346–352.
- Trotz-Williams, L. a, Wayne Martin, S., Leslie, K. E., Duffield, T., Nydam, D. V., Peregrine, A. S. (2007). Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 82(1–2), 12–28.
- Tyzzer, E. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 5, 12–13.
- Tyzzer, E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv Für Protistenkunde*, 26, 394–412.
- Tzipori, S., McCartney, E., Lawson, G., Rowland, A., Campbell, I. (1981). Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. *Res Vet Sci*, 31(3), 358–68.
- Tzipori, S., Smith, M., Makin, T., Halpin, C. (1982). Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. *Vet Parasitol.*, 11(2–3), 121–6.
- Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K., Sherwood, D., Campbell, I. (1983). Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Vet Rec*, 112(6), 116–120.

- Tzipori, S. (1985). *Cryptosporidium*: Notes on epidemiology and pathogenesis. *Parasitology Today*, 1(6), 159–165.
- Tzipori, S. (1988). Cryptosporidiosis in perspective. *Advances in Parasitology*, 27, 63–129.
- Tzipori, S., Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 4(10), 1047–58.
- Uchôa, F., Sudré, A., Macieira, D., Almosny, N. (2017). The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of *Giardiasis* in humans, dogs, and cats. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 59(Aug), e61.
- Upton, S. J., Tilley, M., Brillhart, D. B. (1995). Effects of Select Medium Supplements on in-Vitro Development of *Cryptosporidium-Parvum* in Hct-8 Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 371–375.
- Utsi, L., Smith, S. J., Chalmers, R. M., Padfield, S. (2016). Cryptosporidiosis outbreak in visitors of a UK industry-compliant petting farm caused by a rare *Cryptosporidium parvum* subtype: a case-control study. *Epidemiology and Infection*, 144(5), 1000–9.
- Valenzuela, O., González-Díaz, M., Garibay-Escobar, A., Burgara-Estrella, A., Cano, M., Durazo, M. (2014). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. *PloS One*, 9(4), e96128.
- van Zeeland, Y. R. A., Schoemaker, N. J., Kik, M. J. L., van der Giessend, J. W. B. (2008). Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*). *Avian Diseases*, 52(2), 357–63.
- Vergara-Castiblanco, C., Quilez, J. (2004). Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. *MVZ Córdoba*, 9(1), 363–372.
- Vetterling, J. M., Takeuchi, A., Madden, P. A. (1971). Ultrastructure of *Cryptosporidium wairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology*, 18(2), 248–60.
- Villacorta, I., Peeters, J. E., Vanopdenbosch, E., Ares-Mazás, E., Theys, H. (1991). Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(2), 283–7.
- Villafañe-Ferrer, L. M., Pinilla-Pérez, M., Villafañe Ferrer, L., Pinilla Pérez, M. (2016). Intestinal parasites in children and soil from Turbaco, Colombia and associated risk factors. *Revista de Salud Pública*, 18(1), 117–128.
- Vítovec, J., Koudela, B. (1992). Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. *Vet Parasitol.*, 43(1–2), 25–36.
- Vítovec, J., Hamadejová, K., Landová, L., Kvác, M., Kvetonová, D., Sak, B. (2006). Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53(5), 239–43.
- Waldron, L. S., Ferrari, B. C., Power, M. L. (2009). Experimental Parasitology Glycoprotein 60 diversity in *C. hominis* and *C. parvum* causing human cryptosporidiosis in NSW, Australia. *Experimental Parasitology*, 122(2), 124–127.

- Waldron, L. S., Dimeski, B., Beggs, P. J., Ferrari, B. C., Power, M. L. (2011). Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7757–7765.
- Waldron, L. S., Ferrari, B. C., Cheung-Kwok-Sang, C., Beggs, P. J., Stephens, N., Power, M. L. (2011). Molecular Epidemiology and Spatial Distribution of a Waterborne Cryptosporidiosis Outbreak in Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7766–7771.
- Wang, R., Zhang, X., Zhu, H., Zhang, L., Feng, Y., Jian, F. (2011). Experimental Parasitology Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp . and *Giardia duodenalis* in humans in Henan , China. *Experimental Parasitology*, 127(1), 42–45.
- Wang, H., Zhao, G., Chen, G., Jian, F., Zhang, S., Feng, C. (2014). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Henan, China. *PLoS ONE*, 9(6), e100453.
- Wanyiri, J. W., O'Connor, R., Allison, G., Kim, K., Kane, A., Qiu, J. (2007). Proteolytic processing of the *Cryptosporidium* glycoprotein gp40/15 by human furin and by a parasite-derived furin-like protease activity. *Infection and Immunity*, 75(1), 184–192.
- Wanyiri, J. W., Techasintana, P., O'Connor, R. M., Blackman, M. J., Kim, K., Ward, H. D. (2009). Role of CpSUB1, a subtilisin-like protease, in *Cryptosporidium parvum* infection in vitro. *Eukaryotic Cell*, 8(4), 470–477.
- Wegayehu, T., Karim, M. R., Anberber, M., Adamu, H., Erko, B., Zhang, L., Tilahun, G. (2016). Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species in dairy calves in central Ethiopia. *PLoS ONE*, 11(5), e0154647.
- Weng, Y. B., Hu, Y. J., Li, Y., Li, B. S., Lin, R. Q., Xie, D. H. (2005). Survey of intestinal parasites in pigs from intensive farms in Guangdong Province, People's Republic of China. *Veterinary Parasitology*, 127(3–4), 333–336.
- Wetzel, D. M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M. S., Dubey, J. P., Sibley, L. D. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*, 73(9), 5379–5387.
- Wieler, L. H., Ilieff, a, Herbst, W., Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R. (2001). Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 48(2), 151–9.
- Wielinga, P. R., de Vries, A., van der Goot, T. H., Mank, T., Mars, M. H., Kortbeek, L. M., van der Giessen, J. W. B. (2008). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *International Journal for Parasitology*, 38(7), 809–17.
- Wildmer, G., Sullivan, S. (2012). Genomics and Population Biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology*, 34(2–3), 61–71.
- Wilhelm, C. L., Yarovinsky, F. (2014). Apicomplexan infections in the gut. *Parasite Immunology*, 36(9), 409–420.

- Wilson, W. M., Dufour, D. L., Staten, L. K. (1999). Gastrointestinal parasitic infection, anthropometrics, nutritional status, and physical work capacity in Colombian boys. *American Journal of Human Biology*, 11(6), 763–771.
- Woods, K. M., Tilley, M., Iseli, A., Upton, S. J., Montelone, B. A., Khramtsov, N. V. (1999). Sequence of the gene encoding hsp90e from *Cryptosporidium parvum*. *DNA Sequence : The Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 10(4–5), 339–42.
- World Health Organization. (2015). *Colombia:WHO statisticalprofile. Country statistics and global health estimates. Colombia: WHO statistical profile*.
- Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Nakada, T., Takahashi, Y. (2003). Intraspecies Polymorphism of *Cryptosporidium parvum* Revealed by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and RFLP – Single-Strand Conformational Polymorphism Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4720–4726.
- Wyatt, C. R., Riggs, M. W., Fayer, R. (2010). Cryptosporidiosis in neonatal calves. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 26(1), 89–103.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A., Montali, R. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1578–1583.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W. (2001). Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(3), 492–497.
- Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T. K., Gradus, S., Lal, A. (2001). Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1097–1101.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology*, 17(1), 72–97.
- Xiao, L., Ryan, U. (2004). Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 17(5), 483–490.
- Xiao, L., Zhou, L., Santin, M., Yang, W., Fayer, R. (2007). Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitology Research*, 100(4), 701–6.
- Xiao, L., Fayer, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1239–55.
- Xiao, L., Feng, Y. (2008). Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(3), 309–323.
- Xiao, L., Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology. In Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (Second edi, pp. 120–171). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124(1), 80–9.

- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L., Alves, J., Serrano, M. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431(7012), 557–561.
- Yáñez, M., Acevedo, K. (2013). El Acceso al agua para consumo humano en Colombia. *Revista de Economía Institucional*, 15(29), 125–148.
- Yang, S., Healey, M. C., Du, C., Zhang, J. (1996). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells. *Infection and Immunity*, 64(1), 349–354.
- Yoder, J. S., Beach, M. J. (2010). *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Experimental Parasitology*, 124(1), 31–9.
- Yui, T., Nakajima, T., Yamamoto, N., Kon, M., Abe, N., Matsubayashi, M., Shibahara, T. (2014). Age-related detection and molecular characterization of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* in pre- and post-weaned piglets and adult pigs in Japan. *Parasitology Research*, 113(1), 359–365.
- Zambriski, J. a, Nydam, D. V, Wilcox, Z. J., Bowman, D. D., Mohammed, H. O., Liotta, J. L. (2013). *Cryptosporidium parvum*: determination of ID<sub>50</sub> and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 197(1–2), 104–12.
- Zhang, W., Yang, F., Liu, A., Wang, R., Zhang, L., Shen, Y. (2013). Prevalence and Genetic Characterizations of *Cryptosporidium* spp. in Pre-Weaned and Post-Weaned Piglets in Heilongjiang Province, China. *PLoS ONE*, 8(7).
- Zhao, G. H., Fang, Y. Q., Ryan, U., Guo, Y. X., Wu, F., Du, S. Z. (2016). Dynamics of Th17 associating cytokines in *Cryptosporidium parvum*-infected mice. *Parasitology Research*, 115(2), 879–887.
- Zhu, G., LaGier, M. J., Stejskal, F., Millership, J. J., Cai, X., Keithly, J. S. (2002). *Cryptosporidium parvum*: The first protist known to encode a putative polyketide synthase. *Gene*, 298(1), 79–89.
- Zintl, A., Neville, D., Maguire, D., Fanning, S., Mulcahy, G., Smith, H. V, De Waal, T. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitology*, 134(Pt 11), 1575–82.
- Zintl, A., Protocor, C., Dewaall, T., Shanaghy, S., Mulcahy, G. (2009). The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiology and Infection*, 122(2), 270–277.